

Strukturaufklärung und Pharmakologie
der Saponine aus *Colubrina asiatica* Brongn

Sigrid Ott

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0068

Strukturaufklärung und Pharmakologie
der Saponine aus Colubrina asiatica Brongn

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Sigrid Ott
aus
München

November 1980



1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. M.H. Z e n k

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.80

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München angefertigt.

Für die Hilfe, die mir bei der Durchführung der Arbeit zuteil wurde, möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen:

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. H. WAGNER, für die Anregung zu dieser Arbeit, für deren großzügige Förderung und für sein stets großes Interesse am Fortgang meiner Untersuchungen.

Herrn Dr. V.M. CHARI für die Aufnahme einiger ^{13}C -NMR-Spektren und die hilfreichen Diskussionen.

Herrn Dr. O. SELIGMANN und seinen Mitarbeiterinnen für die chemisch-physikalischen Untersuchungen, die an diesem Institut durchgeführt werden konnten.

Herrn Dr. A. NESZMELYI von der Ungarischen Akademie der Wissenschaften für die Bestimmung der Spin-Gitter-Relaxationszeiten.

Herrn Dr. V. FORMACEK und Herrn Dr. W.E. HULL von der Fa. Bruker-Physik, Karlsruhe, für die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren.

Herrn Dr. H.-R. SCHULTEN, Institut für Physikalische Chemie der Universität Bonn, für die Aufnahme der FD-Massenspektren.

Herrn Dr. G. WEGENER, Institut für Holzforschung der Universität München, für die Aufnahme der Zuckerchromatogramme.

Schließlich danke ich noch den vielen nicht genannten Kollegen und Institutsangehörigen, die mir in verschiedener Weise behilflich waren und die Arbeit und das Leben am Institut erleichtert haben.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	2
A. Bisherige Untersuchungen der Colubrina-Arten	2
1.0 Vorkommen und botanische Beschreibung von Colubrina asiatica	2
2.0 Verwendung der Colubrina-Arten in der Volksmedizin	4
3.0 Bisher isolierte Inhaltsstoffe der Gattung Colubrina	4
4.0 Bisherige pharmakologische Untersuchungen . . .	5
B. Orientierende chemische und chromatographische Voruntersuchungen	6
1.0 Alkaloidscreening	6
2.0 Flavonscreening	8
3.0 Saponinscreening	10
4.0 Isolierung der Saponine	12
4.1 Gewinnung eines Rohsaponingemisches	12
4.2 Auftrennung des Saponingemisches	13
5.0 Strukturaufklärung von Saponin 1	16
5.1 Darstellung des Sapogenins	16
5.2 Strukturaufklärung des Aglykons	17
5.3 Qualitative und quantitative Zucker- und Säurebestimmung	24
5.4 Aufklärung des genuinen Aglykon	28
5.4.1 ¹³ C-NMR-Untersuchung von Saponin 1	28
5.4.2 Hochfeld- ¹ H-NMR-Spektrum von Saponin 1	32
5.5 Aufklärung von Zuckersequenz, Zuckerverknüpfung und Acetylierungsstellen	34
5.5.1 Partialhydrolyse	34
5.5.2 Permethylierung und Herstellung der Alditol- acetate	35
5.5.3 Felddesorptions-Massenspektrum von Saponin 1	38

5.5.4	Spin-Gitter-Relaxationszeitmessung von Saponin 1	39
5.5.5	¹³ C-NMR-Spektrum von entacetyliertem Saponin 1	40
5.5.6	¹³ C-NMR-Spektrum von Saponin 1, Zuckerbereich	44
6.0	Strukturaufklärung von Saponin 2	47
C.	Pharmakologische Untersuchungen	57
1.0	Direkte Bestimmung der Spontanmotilität	57
2.0	Bestimmung der Barbiturat-Narkose-Verlängerung	61
3.0	Antagonistische und synergistische Wirkung zu Amphetamin und Chlordiazepoxid	61
4.0	Akute Toxizitätsprüfung	62
Z U S A M M E N F A S S U N G		65
E X P E R I M E N T E L L E R T E I L		67
1.0	Herkunft der Droge	67
2.0	Herkunft der Testsubstanzen	67
3.0	Allgemeine Arbeitsmethoden	67
3.1	Dünnschichtchromatographie	67
3.1.1	Adsorbens	67
3.1.2	Laufmittelsysteme	67
3.1.3	Detektion	68
3.2	Fällungsreagentien für Alkaloide	70
3.3	Präparative Dünnschichtchromatographie	71
3.4	Säulenchromatographie	72
3.5	Gaschromatographie	73
4.0	Allgemeine chemische Arbeitsmethoden	73
4.1	Hydrolysen	73
4.2	Acetylierung	74
4.3	Entacetylierung	75
4.4	Permethylierung nach HAKOMORI	75
4.5	Methylzuckeralditolacetate nach BJÖRNDAL	76
5.0	Physikalisch-chemische Untersuchungen	76

6.0	Spezielle Arbeitsmethoden	78
6.1	Untersuchung auf Alkaloide	78
6.2	DC-Nachweis von Flavonen	78
6.3	Hämolytischer Index	79
7.0	Isolierungen	79
7.1	Isolierung der Saponingemische	79
7.2	Auftrennung der Saponinfraktion	81
7.3.1	Isolierung des Aglykons	83
7.3.2	Acetylierung des Aglykons	85
8.1	Strukturaufklärung von Saponin 1	86
8.2	Strukturaufklärung von Saponin 2	89
9.0	Motilitätstest im Lichtschrankenkäfig	90
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S		92

E I N L E I T U N G

In einem früher von uns durchgeführten pharmakologischen Screening von volksmedizinisch verwendeten tropischen und subtropischen Pflanzen hatten Extrakte aus den Blättern von Colubrina asiatica Brongn. an der Maus eine überraschend starke sedierende Wirkung gezeigt.

Die Pflanze ist an den Küsten Südostasiens heimisch, findet sich aber weit verbreitet auch in Afrika und auf dem amerikanischen Kontinent. Trotz dieser weiten Verbreitung gibt es in der Literatur keine Hinweise auf eine Verwendung als Beruhigungs- oder Schlafmittel. Die Benützung der Blätter als Waschmittel ist dagegen allgemein bekannt.

In der vorliegenden chemischen und pharmakologischen Untersuchung wurde daher versucht, das Wirkprinzip zu lokalisieren und aufzuklären. Das Ergebnis dieser Arbeit, die zu einem bisher als Sedativum noch nicht bekannten Wirkstoff-Typ führte, zeigt, daß auch bei Fehlen konkreter Angaben über eine arzneiliche Wirkung einer Pflanze die Existenz solcher Wirkstoffe nicht auszuschließen ist.

ALLGEMEINER TEIL

A. Bisherige Untersuchungen der Colubrina-Arten

1.0 Vorkommen und botanische Beschreibung von Colubrina asiatica

Bei *Colubrina asiatica*, Brongn. (Syn. *Ceanothus asiaticus*, Linn., *Ceanothus capsularis*, Forst., *Rhamnus laevigatus*, Sol) Familie Rhamnaceae, handelt es sich um einen Strauch, der eine Höhe von 6 m erreichen kann. Die Blätter, 5 - 9 cm lang, 2 - 6 cm breit und unbehaart, sind an der Basis stumpf, spitz zulaufend und am Blattrand gezähnt. Am Blattgrund entspringen 3 Nerven. Mittelrippe und Seitennerven sind leicht eingesenkt, auf der Blattunterseite hervorstehend.

Die grünlichen Blüten wachsen als achselständige Trugdolden. Der Kelch ist trichterförmig und 5-lappig, die 5 Blumenblätter dreieckig und weiß.

Die Früchte bilden kugelförmige, dreifächerige Kapseln, die einen Durchmesser von 7 - 9 mm besitzen und am Grunde von einem Kelch umgeben sind. Jedes Fach enthält einen schwarzen, eckigen Samen (1,2).

Colubrina asiatica besitzt eine ziemlich weite Verbreitung. Man findet die Pflanze entlang der Küsten auf den Philippinen, in Afrika, Indien, Malaysia, Australien, Polynesien und Amerika.



Abb. 1

C O L U B R I N A A S I A T I C A

Nach Woody Flora of Taiwan (2):

- a) Zweig mit Blüten und Früchten
- b) Blütenstand
- c) Blüte
- d) senkrechter Schnitt durch die Blüte
- e) Fruchtkapsel
- f) Querschnitt durch die Frucht

2.0 Verwendung der Colubrina-Arten in der Volksmedizin

Die Blätter von Colubrina asiatica werden auf den Philippinen als Abkochung zur Linderung von Hautreizungen und zur Heilung von Hautkrankheiten verwendet (1).

In Samoa und Fiji (3) gelten die Blätter als ideales Waschmittel, da sie mit Wasser einen seifenähnlichen Schaum bilden. Der Volksname für die Droge auf den Fiji-Inseln "Vuso levu" bedeutet soviel wie "viel Seifenschaum". In Samoa wird sie besonders zum Reinigen und Bleichen der weißen zotteligen Matten benutzt, die die Eingeborenen aus den Fasern einer Urticaceae, *Cypholophus macrocephalus*, herstellen.

Zwei andere Arten der Gattung *Colubrina* Brongn., *C. ferruginosa* und *C. reclinata*, liefern auf den Westindischen Inseln die "Palomabi-Rinde", die zusammen mit Zuckersirup zur Darstellung eines Kohlensäure-reichen, gegen Verdauungsstörungen und andere Leiden wirksamen Getränkes benutzt wird (4,5).

In Brasilien findet die Rinde von *C. rufa* Reissek. (4) Anwendung als Febrifugum und Abführmittel.

3.0 Bisher isolierte Inhaltsstoffe der Gattung Colubrina

TSCHESCHE (6) isolierte aus der Rinde von *C. asiatica* das Tetrahydro-isochinolin-Derivat O-Methyl-Dauricin. Aus der Rinde von *C. faralaotra* ssp. *sinuata* wurden von GUINAUDEAU u.a. (7,8) drei Flavonaglykone und ein Quercetin- sowie Kämpferol-triglykosid, Faralatrosid und Faratrosid, außerdem 16 Alkaloide der Benzylisochinolin- Bisbenzylisochinolin-, Aporphin- und Proaporphin-Reihe, unter ihnen Nuciferin, Limacin, Faralaotrin und Magnoflorin isoliert und strukturell aufgeklärt.

WANI (9,10) isolierte aus *C. texensis* Gray ein antileukämisch wirkendes Ansamakrolid Colubrinol und das cancerostatisch wirkende Peptidalkaloid Texensin.

In der Rinde von C. granulosa Perk. wurden von ROITMAN (11) pentacyclische Triterpensäuren isoliert, die sich von der Lupeolsäure, Alphitolsäure, Betulinsäure und der Ceanothsäure ableiten. Außerdem wurde aus der gleichen Rinde ein 2,4,6-Trihydroxy-2-(4-hydroxybenzyl)-cumaran-3-on, das Maesopsin, erhalten. Aus C. arborescens Mill. konnte ein Glykosid (Colubri-
nosid) gewonnen werden, das ein strukturell noch unbekanntes Steroid-Aglykon besitzt, und die Zucker Arabinose, Galactose und Glucose enthält (12,13).

4.0 Bisherige pharmakologische Untersuchungen

Von Colubrina asiatica wurde bisher nur das ätherische Öl der Früchte (14) pharmakologisch untersucht. Es zeigte keinen deutlichen Einfluß auf die Aktivität des zentralen Nervensystems, erniedrigte aber deutlich die rektale Temperatur ohne Sedierung. An anästhesierten Hunden wurde eine Blutdrucksenkung und am Froschherzen eine schwache diastolische Phase beobachtet. Beide Wirkungen konnten durch Atropin blockiert werden. Es wirkte antagonistisch auf die von Acetylcholin, Histamin und Barium hervorgerufenen Spasmen der glatten Muskulatur, während es an der Skelettmuskulatur die kontrahierende Wirkung von Acetylcholin nur teilweise zu antagonisieren vermochte.

B. Orientierende chemische und chromatographische Voruntersuchungen

Zur Durchführung der chromatographischen und chemischen Vorproben wurden ein Äthanol- bzw. Methanol-Gesamtextrakt und ein Chloroformextrakt nach Vorbehandlung der Droge mit 20%iger Natriumcarbonatlösung hergestellt. Geprüft wurde zunächst auf die Stoffklassen, die bisher bereits in der Rhamnaceenfamilie aufgefunden worden waren.

1.0 Alkaloidscreening

Ein Kieselgel-Dünnschichtchromatogramm des alkoholischen Gesamtextraktes, durchgeführt im Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser (64:36:8), zeigte nach Besprühen mit Dragendorff-Reagenz gelbbraun gefärbte Flecken im R_f -Bereich 0.2 - 0.6. Da in der Literatur Dragendorff-positive Reaktionen auch von stickstofffreien Verbindungen beschrieben wurden (15,16), die z.B. eine konjugierte Carbonyl- oder Lactongruppe enthalten, wie dies bei manchen Steroiden, Triterpenen, Cumarinen und α -Pyronen der Fall ist, müssen solche Ergebnisse mit Vorsicht bewertet werden. Verdacht auf das Vorliegen N-freier Verbindungen besteht, wenn sich durch Nachbesprühen mit 10% NaNO_2 -Lösung die Nachweisempfindlichkeit stark erhöht (17).

Zur Untersuchung auf Alkaloide wurde folgendes Extraktionsverfahren angewendet:

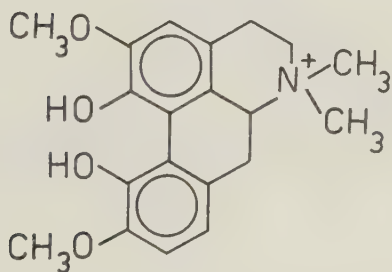
Etwa 20 g Droge wurden mit 150 ml Äthanol 2 Stdn. unter Rückfluß extrahiert, der Extrakt nach dem Abkühlen filtriert und zur Trockne eingengt. Den Rückstand verteilte man unter Rühren zwischen 50 ml 10% Na_2CO_3 -Lösung und 50 ml Chloroform. Die wässrige alkalische Phase wurde noch zweimal mit 25 ml Chloroform ausgeschüttelt und anschließend die wässrige Phase mit MAYERS und VALSERS Reagens auf quartäre Ammoniumbasen geprüft. Die vereinigten Chloroformphasen wurden ebenfalls auf ca. 3 - 4 ml eingengt und in einem

Zentrifugenglas mehrmals gegen 1 - 2 ml 5% Salzsäure verteilt, bis ein Volumen von 5 ml HCl-Phase erreicht war. Davon wurden je 2 ml mit je 3 Tropfen MAYERS und VALSERS Reagenz versetzt und mit einer in gleicher Weise behandelten Vergleichslösung von 1 mg Brucin in 2 ml 2% HCl verglichen.

Da nur in der wässrigen Phase die Fällungsreaktion deutlich positiv ausgefallen war, sollten nur quartäre Ammoniumbasen vorhanden sein.

Eine DC-Vergleichsuntersuchung mit mehreren bisher in Colubrina aufgefundenen Alkaloiden im Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser (64:36:8) ergab nach Behandlung mit dem Dragendorff-Reagens nach MUNIER und MACHEBOEUFF eine Übereinstimmung mit Magnoflorin, einem 1,11-Dihydroxy-2,10-dimethoxy-N-dimethyl-aporphin.

Die anderen, ebenfalls Dragendorff-positiven Flecken konnten später Saponin-Verbindungen zugeordnet werden.

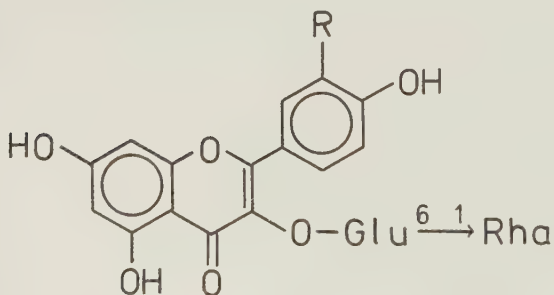


MAGNOFLORIN

2. Flavonscreening

Der methanolische Gesamtextrakt wurde im Fließmittel Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:16:14) sowie in Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:2) und Äthylacetat-Äthylmethylketon-Ameisensäure-Wasser (5:3:1:1) auf Kieselgel chromatographiert. Als Testsubstanzen dienten Rutin, Kämpferol-3,7-diglucosid, Kämpferol-3-rutinosid, Kämpferol-3-arabinosid sowie das von GUINAUDEAU u.a. (8) aus *Colubrina faralao* isolierte Kämpferol-3-O-[6''-(3''-O-β-D-glucopyranosyl-4'''-O-acetyl)α-L-rhamnopyranosyl]-galactosid.

Detektiert wurde mit Diphenylborsäure-β-aminoäthylester (Naturstoffreagens nach NEU (18))-Polyäthylenglykol 400 (Merckofix^R). Auf Grund ihres Laufverhaltens und der Anfärbbarkeit konnten die Flavone als Quercetin-3-rutinosid und Kämpferol-3-rutinosid identifiziert werden. Beim dritten Flavon im oberen R_f -Bereich muß es sich um ein weiteres Kämpferolderivat handeln, da es sich nach Besprühen mit Naturstoffreagens gelb anfärbte.



R = H

KÄMPFEROL-3-O-RUTINOSID

R = OH

QUERCETIN-3-O-RUTINOSID

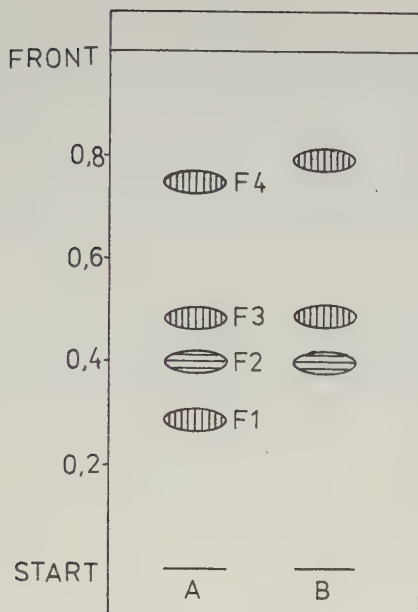


Abb. 2

DC zum Flavonscreening

A: Vergleichssubstanzen

B: Methanolischer Gesamtextrakt

F1 Faralatosid

F2 Quercetin-3-rutinosid

F3 Kämpferol-3-rutinosid

F4 Kämpferol-3-arabinosid

Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser: 10:2:2

Detektion: Naturstoffreagens nach NEU

Polyäthylenglykol 400



grüngelb bei 360 nm



orangegelb bei 360 nm

Adsorbens: Kieselgel 60 F₂₅₄

3.0 Saponinscreening

Da die Droge in der Volksmedizin als Seifenersatzmittel Verwendung findet und HEGNAUER (19) das Vorkommen von Saponinen bei Rhamnaceen beschreibt, war die Anwesenheit von Saponinen wahrscheinlich.

Nach Einengen des Methanolextraktes, Aufnahme des Rückstandes in Wasser und kräftigem Schütteln bildete sich ein sehr beständiger Schaum, der sich auch nach 2 Stdn. noch nicht ganz zurückgebildet hatte.

Zur weiteren Prüfung wurde der methanolische Gesamtextrakt auf 2 Kieselgelplatten im System Chloroform-Methanol-Wasser (64:36:8) chromatographiert. Eine Platte wurde mit KOMAROWSKY-Reagens besprüht, wobei im R_f -Bereich 0.37 - 0.62 eine Reihe von blau gefärbten Flecken entstanden. Besprühen der zweiten Platte mit einer Blutkörperchensuspension ergab an den gleichen Stellen die für Saponine charakteristischen Hämolysereaktionen in Form weißer Flecken auf rotbraunem Hintergrund.

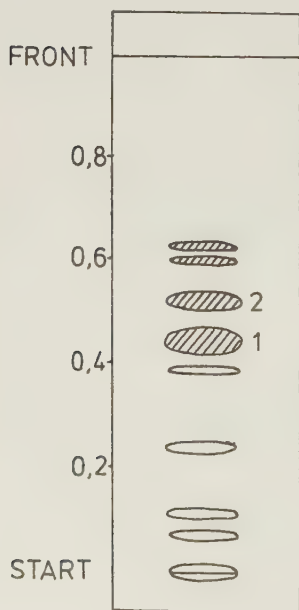


Abb. 3

DC des Methanolextraktes

Chloroform-Methanol-Wasser:
64:36:8

Detektion:

1. KOMAROWSKY-Reagenz

2. Blutkörperchensuspension

○ Löschung unter UV_{254}

▨ Komarowsky-positiv
Hämolyse

1 = Saponin 1

2 = Saponin 2

Kieselgel 60 F_{254}

Bestimmung des hämolytischen Index

Hohe hämolytische Aktivitäten weisen monodesmosidische Steroid- und Triterpensaponine auf, während z.B. die sauren Monodesmoside und neutralen Triterpenbisdesmoside keine oder nur sehr geringe Wirksamkeit besitzen. Dabei hängt die hämolytische Aktivität eines Saponins im wesentlichen von der Struktur des Aglykons ab. Der Zuckeranteil hat nur einen verstärkenden oder abschwächenden Einfluß.

Der hämolytische Index ⁺⁾ wurde nach einer von der Arzneibuchmethode etwas abweichenden Institutsvorschrift (20) bestimmt. Die hämolytische Aktivität wird im Vergleich zu einem Standardsaponin bestimmt und errechnet sich nach der folgenden Formel:

$$\text{hämolytische Aktivität} = S \frac{a}{b}$$

S = hämolytische Wirkung des Saponins auf Rinderblut = 30 000

a = Menge an Saponin in Gramm, die vollständige Hämolyse hervorruft

b = Menge an Droge in Gramm oder einer Zubereitung in ml, die vollständige Hämolyse hervorruft.

Wir fanden für die Droge einen hämolytischen Index von 2000. Verglichen damit liegen die Werte "typischer" Saponindrogen zwischen 200 und 6100.

+) Unter dem hämolytischen Index wird der reziproke Wert jener Verdünnung einer Saponin-haltigen Lösung verstanden, in der 1 g Droge bzw. 1 ml eines galenischen Präparates unter den angegebenen Bedingungen gerade noch totale Hämolyse hervorruft.

4.0 Isolierung der Saponine

Nach den bisherigen Erfahrungen wird die Gewinnung reiner Saponine durch die starken adsorbierenden Eigenschaften der sie begleitenden Mineralsalze bzw. Farbstoffe, phenolischen Verbindungen und Zucker mehr oder weniger stark erschwert (21). Zum anderen liegen die Saponine zumeist als komplizierte Mischungen sehr schwer trennbarer Einzelverbindungen vor, die sich oft nur geringfügig im Aglykon oder Zuckerteil unterscheiden.

Nach den von TSCHESCHE (22) ausgearbeiteten Isolierungsvorschriften wird zunächst ein Rohsaponingemisch gewonnen, das möglichst keine nichtsaponinischen Bestandteile mehr enthalten soll, gefolgt von einer Auftrennung dieses Gemisches in die Einzelkomponenten.

4.1 Gewinnung eines Rohsaponingemisches

Die Droge wurde mit 90%igem Methanol extrahiert. Nach dem Ausschütteln des wässrigen Methanolextraktes mit Petroläther und Cyclohexan wurde dieser auf ein Drittel eingeeengt. Der konzentrierte Extrakt wurde durch Ausschütteln mit Chloroform und anschließend mit n-Butanol weiter aufgetrennt. Dabei befand sich die Hauptmenge der Saponine in der Butanolphase. Der stark eingeeengte Butanolauszug wurde in wenig Methanol 70% gelöst und unter Rühren in Äther eingetroppt. Der Niederschlag wurde abgenutscht und nochmals in gleicher Weise umgefällt. Durch die Ätherfällung werden vor allem unpolare Substanzen abgetrennt, während polare Verunreinigungen mit ausgefällt werden. Die Fällung war noch stark mit phenolischen Verbindungen und Oligosacchariden verunreinigt.

In einem zweiten Isolierungsansatz versuchten wir die phenolischen Verunreinigungen durch Filtration des Butanolextraktes über inaktiviertes Aluminiumoxid (durch Wasserzusatz, Verhältnis Substanz: Al_2O_3 = 1:7.5) zu entfernen. Das Filtrat ergab

nach dem Einengen einen immer noch gelbgrün gefärbten Rückstand. Außerdem zeigte die Chromatographie, daß durch Adsorption Saponine verloren gegangen waren.

Deshalb versuchten wir eine Reinigung mit Aktivkohle. Die Droge wurde wie vorher beschrieben extrahiert, der Butanolextrakt vollkommen eingeeengt, der Rückstand in Methanol gelöst und 5 Stdn. mit Aktivkohle (23) geschüttelt (Verhältnis Substanz: Kohle = 2:1). Die so vorgereinigte Fraktion wurde noch über eine Al_2O_3 -Säule (neutral, Aktivitätsstufe III) in der oben angegebenen Weise filtriert. Es resultierte ein hellgelbes Substanzgemisch. Diese Methode hat sich als das günstigste Isolierungsverfahren erwiesen. Der Verlust an Saponinen war hierbei am geringsten, die Reinheit der isolierten Gemische am größten.

4.2 Auftrennung des Saponingemisches

Die am besten geeigneten Fließmittelsysteme wurden durch DC des Saponingemisches an Kieselgelplatten ermittelt, da sich die hiermit erreichten Trennungen in der Regel direkt auf die Säulenchromatographie übertragen lassen. Die Auftrennung des Rohsaponingemisches versuchten wir zunächst an einer Kieselgelsäule mit dem Fließmittel Äthylacetat-Methanol-Wasser (70:15:15). Dadurch konnten die Hauptsaponine angereichert und ein Teil der Verunreinigungen abgetrennt werden. Die Verwendung von feinem Kieselgel (Merck, Korngröße unter 0,063 mm) und Chloroform-Methanol-Wasser (64:36:8) als Trenngemisch brachte keine wesentliche Verbesserung.

Bessere Trennergebnisse erzielten wir mit Sephadex LH 20 bei einem Substanz : Sephadex - Verhältnis 1 : 100 und Methanol als Elutionsmittel. Auf diese Weise konnten z.B. die von uns als Saponin 1 und 2 bezeichneten Verbindungen fast rein gewonnen werden. Die Verluste an Saponinen waren hier nicht so groß wie bei der Kieselgelchromatographie.

In einem weiteren Versuchsansatz setzten wir zur Trennung die verhältnismäßig neue, von TANIMURA et al. (24) entwickelte, Droplet counter-current chromatography (DCC) ein. Dieses Verfahren wurde von OGIHARA (25), OTSUKA (26) und HOSTETTMANN (27, 28) zur Trennung und Reinigung von Naturstoffen, besonders von Saponinen, mit Erfolg angewendet. Die DCC-Methode erwies sich als eine ideale Methode zur Isolierung besonders polarer Verbindungen, da hiermit Trennungen mit hohem Auflösungsvermögen ohne größere Verluste möglich sind.

Als Laufmittel kommen solche in Frage, die zwei nicht mischbare Phasen bilden. Dabei wandern die Tropfen der mobilen Phase durch die mit stationärer Phase gefüllten Glassäulen. Ist die mobile Phase schwerer, wird nach dem absteigenden Verfahren gearbeitet. Ist sie leichter, wird die aufsteigende Methode angewendet. Nicht verwendungsfähig sind Lösungsmittel mit zu hoher Viskosität.

Das geeignete Lösungsmittelsystem kann durch Testung auf Kieselgel-DC-Platten ermittelt werden. Ist der R_F -Wert der zu trennenden Verbindungen größer als 0.4, wird die weniger polare Phase als mobile Phase angewendet. Bei polareren Substanzen ($R_F < 0.4$) sollte die polare Phase als mobile Phase dienen. Sind Verbindungen verschiedener Polarität im Gemisch vorhanden, wird die Trennung in zwei Schritten vorgenommen. Beim ersten Durchgang wird die weniger polare Phase als mobile Phase verwendet. Nach Wiedergewinnung der stationären Phase wird ein zweiter Durchgang mit der polareren Phase als mobiler Phase vorgenommen.

Für die Auftrennung des Saponingemisches aus Colubrina fanden wir das System Chloroform-Methanol-n-Propanol-Wasser (45:60:5:40) als besonders geeignet. Beim ersten Durchgang wurde zur Gewinnung von Saponin 1 mit der oberen Schicht als mobiler Phase gearbeitet. Eine zweite Trennung mit Phasenumkehr lieferte Saponin 2. So konnten im 1. Durchgang aus 500 mg Saponingemisch 200 mg Saponin 1 und 20 mg Saponin 2 gewonnen werden.

Aus der zurückgewonnenen stationären Phase (93 mg) ließen sich anschließend nochmals 62 mg Saponin 2 erhalten.

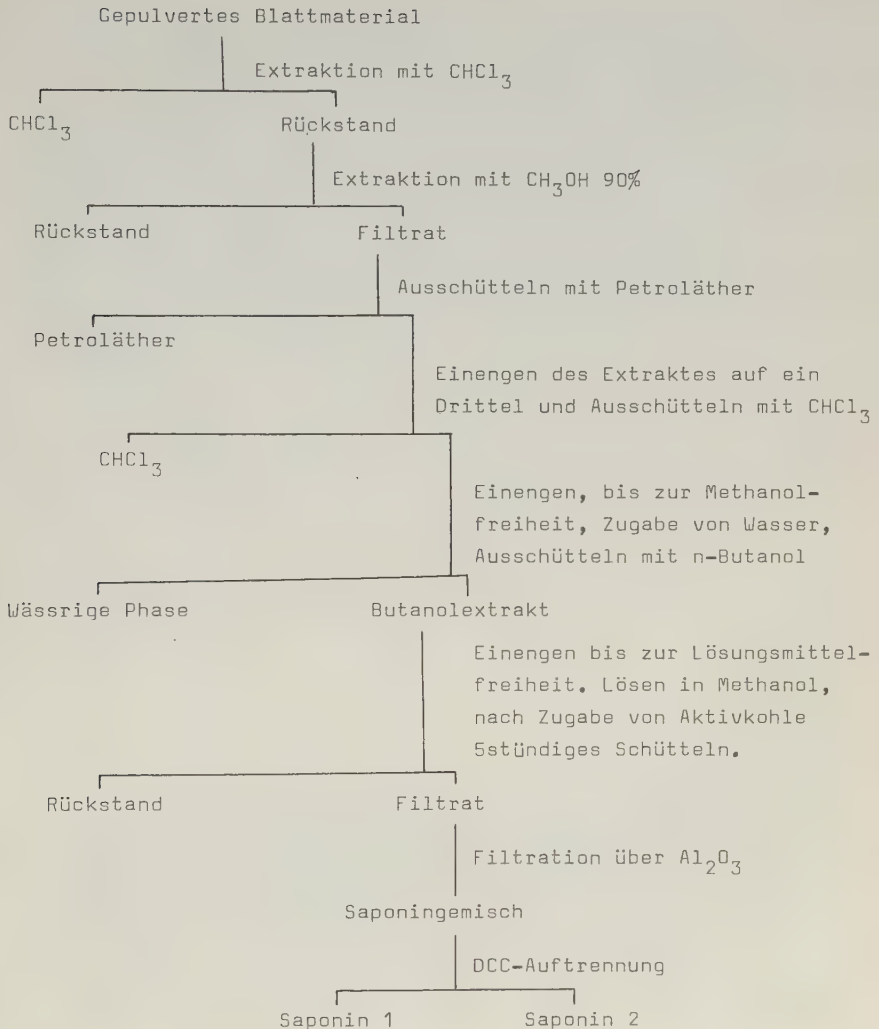


Abb. 4

Isolierungsschema

5.0 Strukturaufklärung von Saponin 1

5.1 Darstellung des Sapogenins

Da orientierende Hydrolyseversuche mit Saponingemischen unterschiedlicher Reinheit gezeigt hatten, daß die beiden Hauptglykoside das gleiche Aglykon besitzen, gingen wir von einem noch ungereinigten Butanol-Extrakt aus. Dieser wurde in der Weise hergestellt, daß die Blätter zunächst mit 90%igem Methanol extrahiert und der Extrakt anschließend zur Entfernung des Chlorophylls mit Cyclohexan ausgeschüttelt wurde. Der auf ein Drittel seines Volumens eingeeengte Methanolextrakt wurde durch Ausschüttelung mit Chloroform und anschließend mit n-Butanol weiter aufgetrennt. Die Butanolphase wurde nach dem Einengen als braune, zähe Flüssigkeit erhalten. Wir lösten den Butanolrückstand in 80%igem Methanol und erhitzen nach Zugabe von konzentrierter Salzsäure 4 Stdn. am Wasserbad. Nach dem Abkühlen wurde die saure Lösung einrotiert und nach Zugabe von Wasser mit Chloroform ausgeschüttelt. Die mit Wasser säurefrei gewaschene Chloroformphase zeigte auf Kieselgelplatte chromatographiert im Laufmittel Toluol-Aceton (8:2) einen Hauptfleck bei $R_f = 0.45$.

Eine Säulentrennung des schwarzbraunen, klebrigen Hydrolyserückstandes auf Kieselgel mit dem oben genannten Fließmittel brachte nur sehr geringe Aglykonausbeuten. Bessere Ergebnisse wurden mit einer Al_2O_3 -Säule (neutral, Aktivitätsstufe III) erreicht, wobei ein Großteil der Verunreinigungen abgetrennt werden konnte. Aus dem gelb gefärbten, methanolischen Filtrat kristallisierte das Aglykon in rosettenförmigen, weißen Kristallen, die bei $178^{\circ}C$ schmolzen.

5.2 Strukturaufklärung des Aglykons

Die DC-Untersuchung der Kristalle ergab im Laufmittel Toluol-Aceton (8:2) einen einzigen Fleck bei $R_f = 0.45$. Aus den CH-Werten und dem MS-Molekülpeak $M^+ = 454$ errechnete sich die Summenformel $C_{30}H_{46}O_3$. Damit war das Vorliegen eines Triterpen-gerüsts ziemlich wahrscheinlich. Aus der Summenformel ging weiter hervor, daß die Verbindung 8 Doppelbindungsäquivalente enthalten müßte. Nach dem UV-Spektrum mit den Maxima bei 269, 278 und 289 nm und den Intensitäten $\epsilon = 41\,700$, $52\,900$ und $39\,600$ sollte das Molekül ein konjugiertes Triensystem enthalten.

Im IR-Spektrum ließen sich die konjugierten Doppelbindungen durch die Bande bei 1630 cm^{-1} bestätigen. Auch im Bereich $840 - 790\text{ cm}^{-1}$ deuteten die "out-of-plane"-Deformationsschwingungen auf die Anwesenheit von Alkenen, die Banden bei 1750 und 1730 cm^{-1} auf ein gesättigtes γ -Lacton im Molekül hin.

Zwischen 1390 und 1360 cm^{-1} waren die für Methylgruppen symmetrischen Deformationsschwingungen zu finden. Die Bande bei 3490 cm^{-1} sprach für alkoholische Gruppen, ebenso die OH-Deformationsschwingungen im Bereich von $1410 - 1260\text{ cm}^{-1}$.

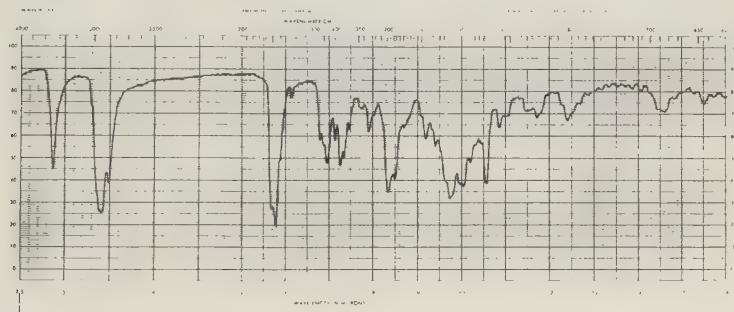


Abb. 5

IR-Spektrum des Sapogenins

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte im Bereich von $\delta = 0.77 - 1.05$ ppm 4 quartärnäre Methylgruppen. Bei $\delta = 1.77$ ppm ergab die Integration 9 Protonen, die 3 vinylen Methylgruppen zugeordnet werden konnten. Die Protonen des Lactonringes gaben ein Doppel-dublett bei 2,27 ppm mit $J = 10$ Hz und $J = 18$ Hz und ein Dublett bei 4,33 ppm ($J = 2$ Hz). Im Bereich von $\delta = 5.2 - 6.3$ ppm waren die für ein konjugiertes Doppelbindungssystem charakteristischen Protonen zu erkennen. Die übrigen Protonen lieferten breite Multiplettsignale im Bereich von 1.12 - 1.68 ppm.

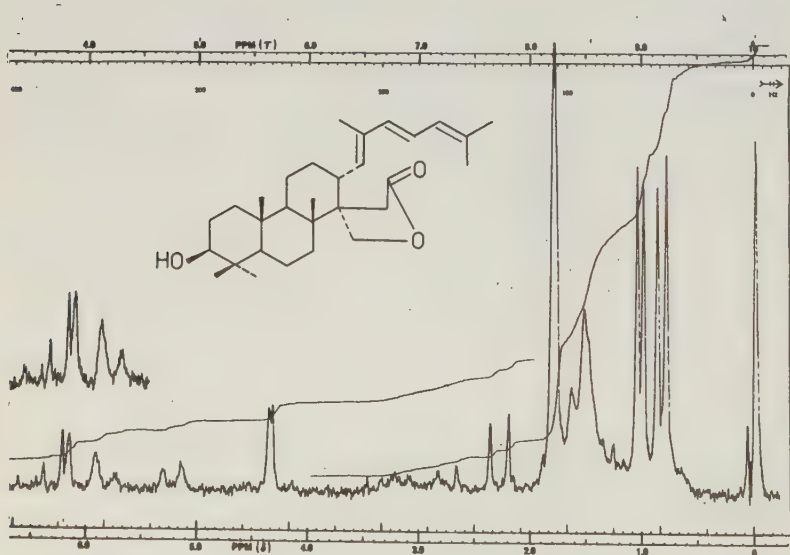


Abb. 6

60 MHz- ^1H -NMR-Spektrum des Sapogenins

Bei einem Vergleich der Spektren unseres Sapogenins und seines Monoacetates mit denen bekannter Triterpenlactone gleicher Summenformel fanden wir die Identität mit dem bekannten Ebelinlacton.

Das Monoacetat zeigte im Mischschmelzpunkt mit authentischem Acetyl-Ebelinlacton keine Depression. Auch das Überlagerungs-IR-Spektrum stimmte überein.

Acetylebelinlacton ist im kristallinen Zustand sehr stabil, während sich Ebelinlacton schon nach wenigen Wochen durch Autoxidation der konjugierten Seitenkette zersetzt (29).

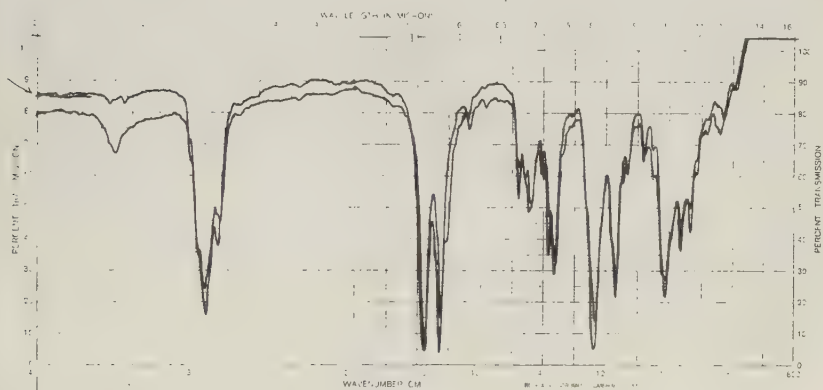
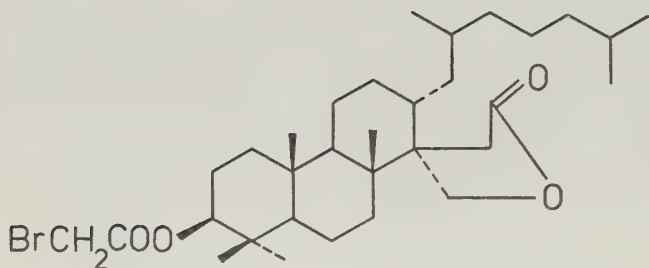


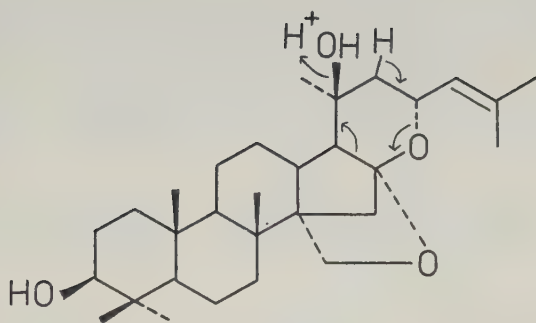
Abb. 2

Überlagerungs-IR-Spektrum des Sapogeninmonoacetates mit
Acetylebelinlacton

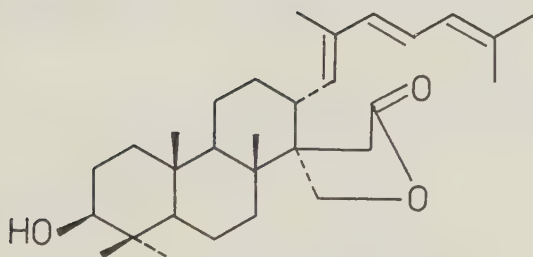
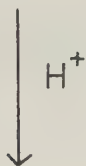
Dieses Aglykon ist bereits in mehreren Pflanzen aufgefunden worden. EADE et al. (30) isolierten die Verbindung aus *Emmenospermum alphonseoides* F. Muell. (Rhamnaceae) und nannten sie Ebelinlacton. Die Struktur wurde durch Röntgenstrukturanalyse des Bromacetyl-Hexahydroebelinlactons (31,32) bewiesen.



Aus *Zizyphus jujuba* Mill., *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) und *Bacopa monniera* (L.) Wettst. (Scrophulariaceae) wurde von SHIBATA et al. (33) nach Säurehydrolyse der Saponine das gleiche Ebelinlacton erhalten. Es entstand sekundär aus dem genuin vorkommenden Jujubogenin durch Einwirkung von Säuren, wobei unter Wasseraustritt eine Öffnung des D-Ringes stattfindet und sich eine Trien-Seitenkette ausbildet.

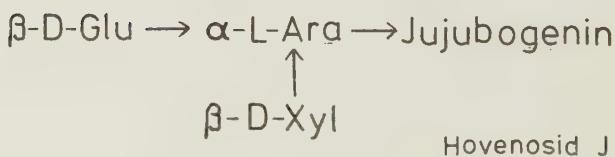
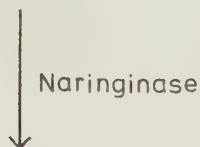
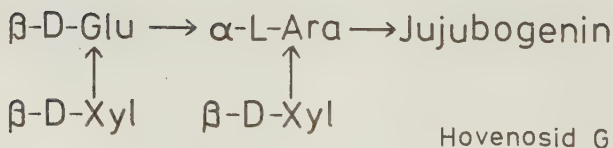
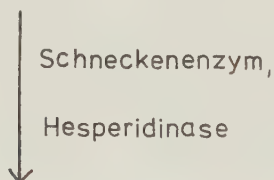
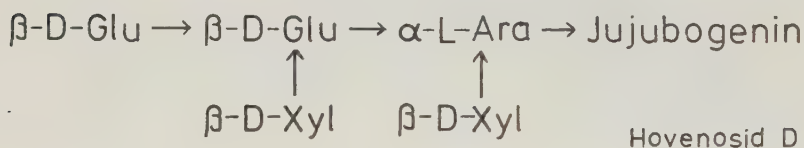


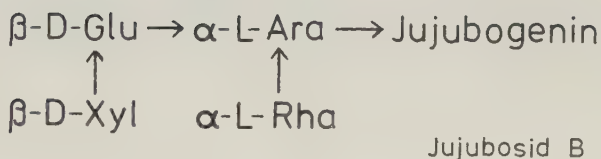
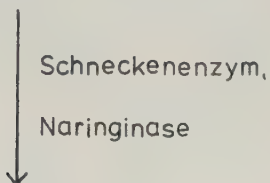
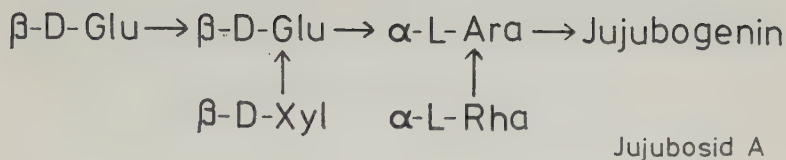
JUJUBOGENIN



EBELINLACTON

Zur Gewinnung des genuinen Aglykons wurden mit den Pentaglykosiden Hovenosid D und Jujubosid A enzymatische Abbaupversuche mit Schneckenenzym, Naringinase und Hesperidinase unternommen (33,34). Sie führten bei Hovenosid D nur zum Triglykosid Hovenosid I, während sich Jujubosid A unter den gleichen Bedingungen unter Verlust von Glucose nur zu einem Tetraglykosid (Jujubosid B) abbauen ließ.





Erst durch den Smith-deMayo-Abbau mit Natriumperjodat konnte das genuine Jujubogenin erhalten werden. Es handelt sich um ein Triterpen vom Dammarantyp, wie es auch für die meisten Ginseng-Sapogenine beschrieben wurde.

Eigene Versuche, das Colubrina-Saponin mit Schneckenenzym und Naringinase zu dem gleichen Jujubogenin abzubauen, brachten keinen Erfolg. Chromatographisch hatte sich das Saponin auch nach 7-tägiger Enzymbehandlung nicht verändert. Offenbar ist hierfür eine besondere Zuckeranordnung bzw. - Verknüpfung verantwortlich.

Einen oxydativen Abbau hatten wir wegen der in der Literatur berichteten geringen Ausbeuten nicht unternommen. 500 g Jujubosid B hatten im Versuch nur 17 mg Jujubogenin ergeben (33).

5.3 Qualitative und quantitative Zucker- und Säurenbestimmung

Zur Analyse der Zuckerkomponenten hydrolysierten wir die Saponine nicht mit Salzsäure, sondern mit der erstmals von FENGEL (35) vorgeschlagenen Trifluoressigsäure. Für die quantitative Hydrolyse genügen in der Regel 2 Stdn. Reaktionszeit. Durch die kürzere Hydrolysezeit wird verhindert, daß die einzelnen Zucker zu lange konzentrierten Säuren ausgesetzt sind und dadurch weiterreagieren können. Da die Trifluoressigsäure nach beendeter Hydrolyse nur abgedampft zu werden braucht, kann das Neutralisieren unterbleiben. Beim Neutralisieren mit Ionenaustauschern ist mit Substanzverlusten, mit Bariumhydroxid mit Isomerisierungen zu rechnen.

Die Saponine wurden 1 bzw. 2 Stdn. lang mit 2n- oder 4n-Trifluoressigsäure unter Sieden am Rückfluß hydrolysiert und die Hydrolyselösung mehrmals am Rotationsverdampfer mit Methanol abgezogen, bis der Rückstand säurefrei war. Die freien Zucker wurden dünnschichtchromatographisch in 3 Laufmitteln getrennt und in üblicher Weise identifiziert. Nachgewiesen wurden Glucose, Arabinose und Xylose. Ein bei niedrigem R_f -Wert auftretender Fleck erwies sich nach präparativer Trennung über Kieselgelplatten und nochmaliger Hydrolyse mit 4n-Trifluoressigsäure als ein aus Glucose und Arabinose bestehendes Disaccharid. Nach zweistündiger Hydrolyse des Colubrina-Saponins mit 4n-Trifluoressigsäure wurden nur Monosaccharide nachgewiesen.

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch eine Bestimmung im Zuckeranalysator. Das Prinzip der Methode nach KESLER (36) besteht darin, daß die Neutralzucker als Boratkomplexe an einer stark basischen Ionenaustauschersäule mit einem Boratpuffer-

gradienten aufgetrennt und nach Elution mit Orcin/Schwefelsäure umgesetzt werden. Der entstandene gelbrote Farbkomplex wird beim Absorptionsmaximum 420 nm photometrisch bestimmt.

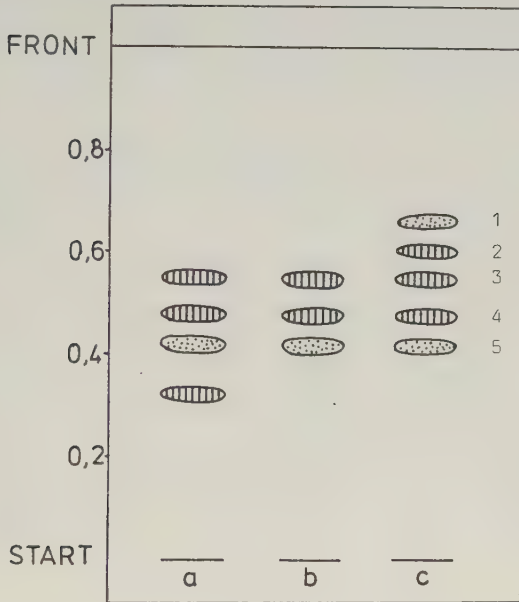


Abb. 8

Zucker-DC des Saponin-Hydrolysates

1 = Rhamnose

4 = Arabinose

2 = Ribose

5 = Glucose

3 = Xylose

a = Hydrolyse mit 2n-Trifluoressigsäure

b = Hydrolyse mit 4n-Trifluoressigsäure

c = Testsubstanzen

Fließmittel: Isopropanol-Pyridin-Wasser (6:2:2)

Adsorbens: Cellulose-Fertigfolien Merck

Detektion: Anilinphthalat-Reagens



Rotfärbung



Braunfärbung

Für Saponin 1 ermittelten wir ein Arabinose-, Xylose- und Glucose-Verhältnis von 34.7%, 29.0% und 36.3% und damit ein Mol-Verhältnis von 1:1:1.

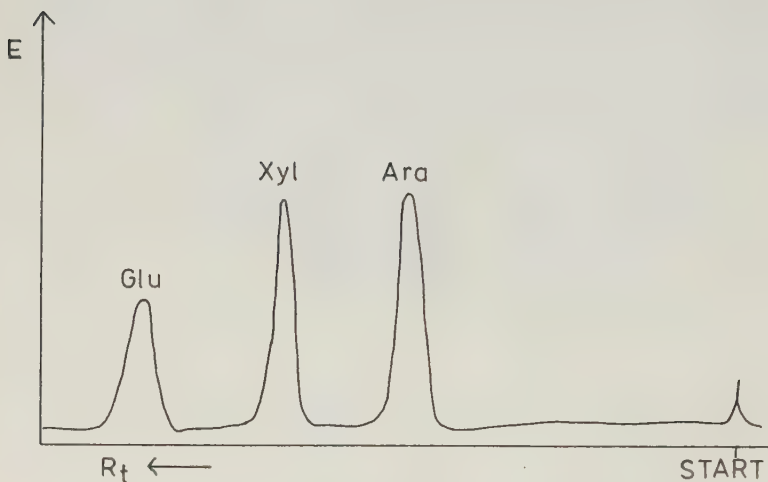


Abb. 9

Zuckerchromatogramm von Saponin 1
hydrolysiert mit 4n-Trifluoressigsäure

Ausgangsmenge: 4 mg

Biotronik ZA 5100

IR- und UV-Spektren bestätigten, daß das dem Saponin genuin zugrunde liegende Aglykon von dem nach Säurehydrolyse erhaltenen Produkt verschieden sein muß.

Da das UV-Spektrum oberhalb 220 nm keinerlei Absorption zeigte, konnte im Saponin ein konjugiertes Triensystem nicht vorhanden sein. Auffallend waren im IR-Spektrum eine Estercarbonylbande bei 1750 cm^{-1} und eine starke asymmetrische C-O-Valenzschwingung bei 1240 cm^{-1} . Beide wiesen, da eine Lactongruppierung nicht vorhanden war, auf das Vorliegen eines Acetylrestes hin (37).

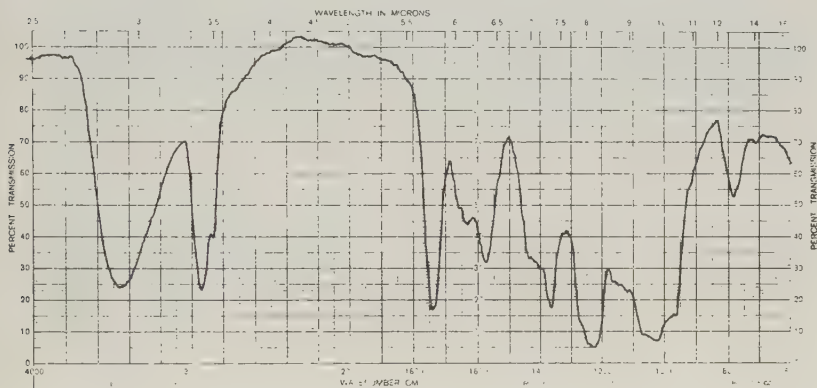


Abb. 10

IR-Spektrum von Saponin 1

Zur Identifizierung der Säure wurde das Saponin mit methanolischer 5%iger Kalilauge unter Rückfluß verseift, die eingeeengte Lösung angesäuert und nach Filtration mit Äther ausgeschüttelt. Die getrocknete und eingeeengte Ätherphase wurde direkt an einer Diäthylhexylsebacinat/20% Sebacinsäure-Säule chromatographiert (38). Durch Vergleich der Retentionszeiten konnte eindeutig Essigsäure identifiziert werden. Somit liegt im Saponin 1 ein Acylglykosid vor.

5.4 Aufklärung des genuinen Aglykon

5.4.1 ^{13}C -NMR-Untersuchung von Saponin 1

Zur weiteren Strukturaufklärung wurde zunächst ein Protonen-breitbandentkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum aufgenommen, da dadurch alle C-Atome als Singulette nachweisbar werden. Obgleich in diesem Spektrum eine Unterscheidung von CH- , $\text{CH}_2\text{-}$ und $\text{CH}_3\text{-}$ Kohlenstoffen nicht mehr möglich ist, vereinfacht sich das Spektrum durch Verschwinden der komplizierten Multipllett-Strukturen. Das Spektrum zeigte die Signale von 50 Kohlenstoffatomen, von denen 16 den Zuckern zugeordnet werden konnten.

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe der Multiplizitäten im "off-resonance"-Spektrum, durch rechnerische Ermittlung unter Anwendung der üblichen shift-Parameter und durch Vergleich mit Daten ähnlicher Dammaran-Triterpene (39,40,41).

Durch off-resonance-Entkopplung der Protonen gelingt es bekanntlich, nur die Kopplung der direkt am Kohlenstoff gebundenen Protonen sichtbar zu machen und damit deren Anzahl zu bestimmen. Charakteristische Multiplette erster Ordnung ermöglichen dann zwischen quartären C-Atomen (Singulett), CH- (Dublett), $\text{CH}_2\text{-}$ (Triplet) und $\text{CH}_3\text{-}$ Gruppen (Quartett) zu differenzieren.

Die Signale bei 172.0 und 169.9 ppm ließen das Vorliegen von zwei veresterten Säuren erkennen. Die quartären Kohlenstoffatome der Carbonylgruppe blieben unter off-resonance-Bedingungen als Singulette erhalten. Die dazugehörigen Signale der $\text{CH}_3\text{-}$ Gruppen der beiden Acetylreste erschienen im typischen Bereich von 21.7 - 21.9 ppm. Zwei Signale im olefinisch-aromatischen Bereich stammten eindeutig von einer Doppelbindung im Molekül. Im off-resonance-Spektrum ergab das eine Signal bei 134.46 ppm keine höhere Multiplizität und erschien als Singulett, während das bei 127.18 ppm zum Dublett wurde. Daraus ist folgendes Doppelbindungselement abzuleiten:

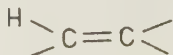


Tabelle 1: Zuordnungstabelle der ^{13}C -NMR-Daten von Sapcin 1
(Pyridin- d_5)

(ppm)	Mult. (off-res.)	Struktur- element	Zuordnung
172.04	S	C=O	Acetyl
169.89	S	C=O	Acetyl
134.46	S	C=C	C-25
127.18	D	C=C	C-24
110.75	S	C $\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \end{smallmatrix}$	C-16
89.23	D	C-O	C-3
68.80	S	C-OH	C-20
68.82	D	C-O	C-23
66.03	T	C-O	C-30
56.50	D	C-H	C-5
54.30	D	C-H	C-17
53.98	S	C	C-14
53.40	D	C-H	C-9
45.61	T	CH ₂	C-22
39.62	S	C	C-4
39.00	T	CH ₂	C-1
37.90	S	C	C-8
37.63	S	C	C-10
37.50	D	C-H	C-13
37.00	T	CH ₂	C-7
36.48	T	CH ₂	C-15
30.16	Q	CH ₃	C-21
28.77	T	CH ₂	C-12
28.16	Q	CH ₃	C-20
26.71	T	CH ₂	C-2
25.66	Q	CH ₃	C-26
22.08	T	CH ₂	C-11
21.87	Q	CH ₃	Acetyl
21.68	Q	CH ₃	Acetyl
19.14	Q	CH ₃	C-27
19.65	Q	CH ₃	C-18
18.50	T	CH ₂	C-6
16.70	Q	CH ₃	C-19
16.43	Q	CH ₃	C-29

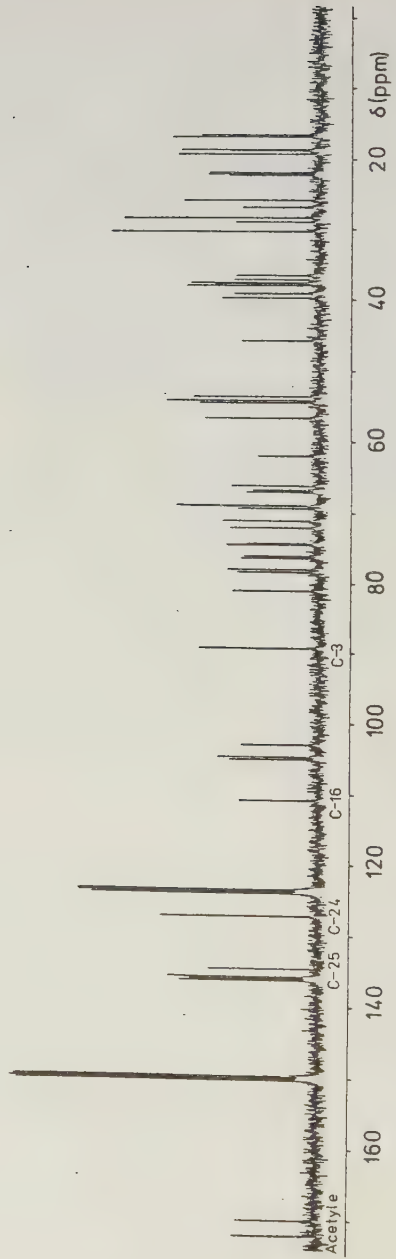
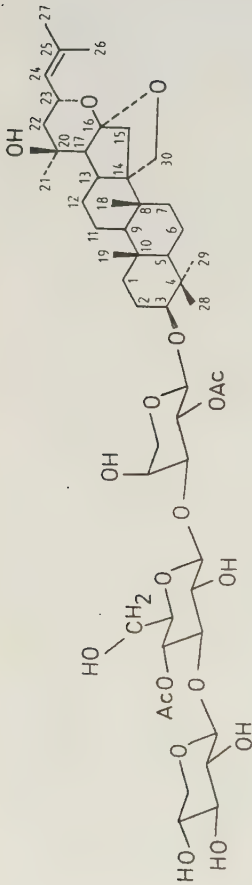
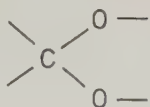


Abb. 11: 100.62 MHz-¹³C-NMR-Spektrum (90 mg Saponin 1/2 ml Pyridin-d₅) Protonen-breitbandentkoppelt

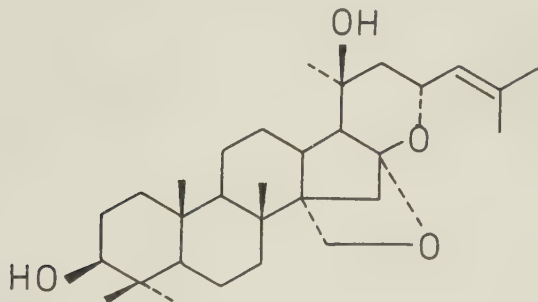
Das Singulett bei 110.76 ppm war einem Kohlenstoffatom zuzuordnen, an das zwei Sauerstoffatome gebunden sein müßten.



Das C-3 des Aglykons war durch die Glykosidierung nach tieferem Feld ($\delta = 89.2$ ppm) verschoben.

Ursprünglich hatten wir angenommen, daß eine Acetylgruppe an die OH-Gruppe am C-20 gebunden war. Diese Annahme wurde durch das Singulett bei 68.83 ppm widerlegt, da es durch Veresterung bei tieferem Feld hätte erscheinen müssen. Zwei Kohlenstoffatome mußten aufgrund ihrer chemischen Verschiebung noch einem Sauerstoff benachbart sein. Da das eine ein Dublett, das andere ein Triplett ergab, sind diese mit einem bzw. zwei Wasserstoffatomen besetzt und entsprechen daher C-23 und C-30. Die übrigen Signale entfallen auf 7 CH_3 -, 8 CH_2 -, 4 CH-Gruppen und 4 quartären Kohlenstoffatome. Die entsprechenden Daten und Zuordnungen sind in Tabelle 1, S. 29, wiedergegeben. Die Signale der Zuckerkohlenstoffatome sind hierbei nicht mitaufgeführt.

Wie aus einem Vergleich mit den ^{13}C -Daten der Literatur (39) eindeutig hervorgeht, ist das genuine Aglykon identisch mit Jujubogenin.



JUJUBOGENIN

5.4.2 Hochfeld- ^1H -NMR-Spektrum von Saponin 1

In Übereinstimmung mit den ^{13}C -NMR-Daten erschienen im ^1H -NMR-Spektrum die Signale von zwei Acetylgruppen als Singulette bei $\delta = 2.20$ und 2.32 ppm. Ebenfalls als Singulette traten die vier Methylgruppen in Resonanz, die wegen der fehlenden Kopplung an quartäre C-Atome gebunden sein müssen ($\delta = 0.76, 0.87, 1.06, 1.12$). Die Methylgruppe an C-20 war durch die entschirmende Wirkung der OH-Gruppe nach $\delta = 1.40$ ppm verschoben. Stärkeren Einfluß hatte die Doppelbindung auf die daran befindlichen Methylgruppen, so daß diese bei tieferem Feld bei $\delta = 1.69$ u. 1.70 ppm als Singulette in Erscheinung traten. Das Proton am C-3 erschien bei 3.16 ppm (1H , dd, $J = 12.5, 3$ Hz); die Kopplung war nur im gedehnten Spektrum zu sehen.

Die anomeren Protonen der Zucker wurden alle mit gleicher Kopplung von $J = 7.5$ Hz bei $4.63, 4.87$ und 5.49 ppm sichtbar. Die Protonen an den acetylierten C-Atomen bei $\delta = 5.78$ und 5.85 ppm spalteten zu einem Doppeldublett mit $J = 7.5$ und 5 Hz auf. Das Protonen-NMR-Spektrum bestätigte die Strukturelemente des Aglykons und das Vorliegen von drei Zuckern, die β -Verknüpfung aufweisen müßten. Die Verknüpfungsstellen waren hieraus nicht ablesbar.

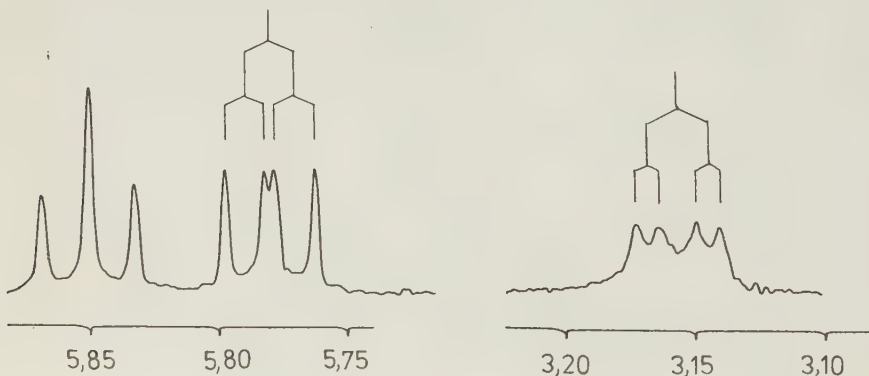


Abb. 12

500 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Saponin 1, Ausschnitte aus gespreiztem Spektrum

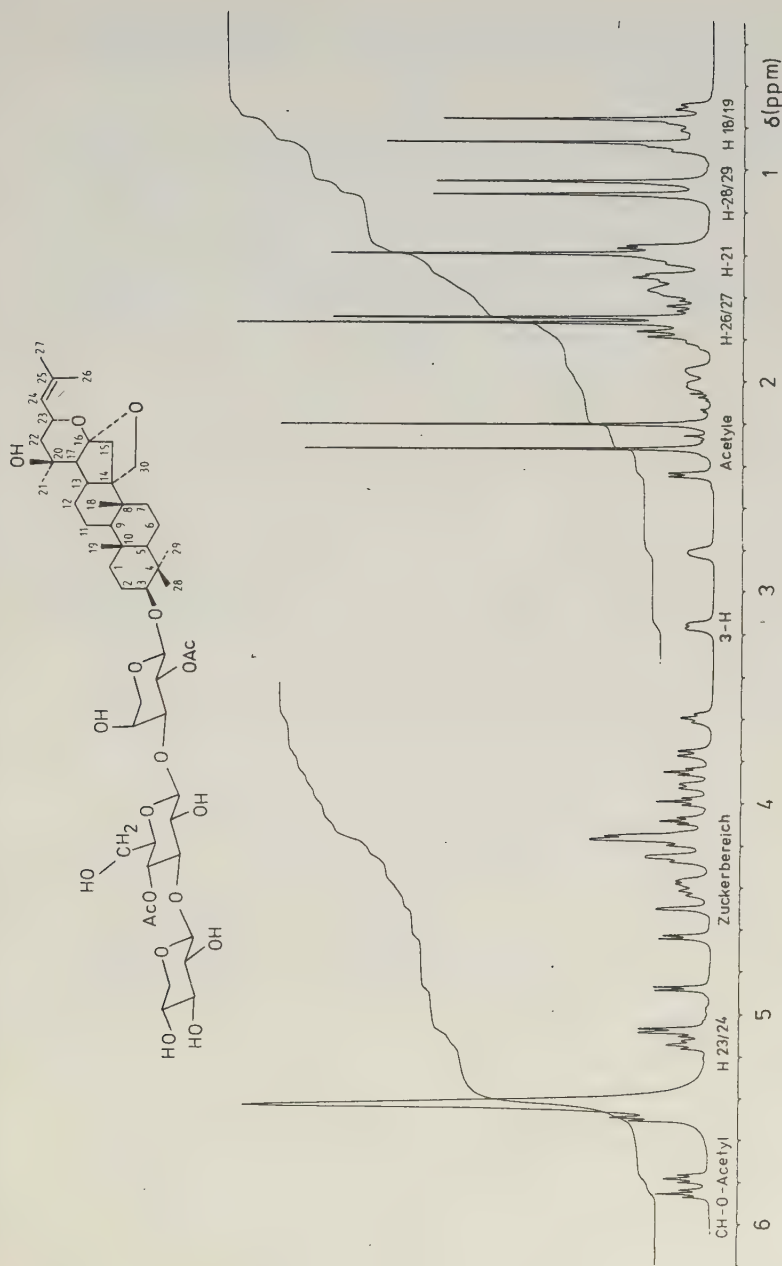


Abb. 13: 500 MHz-¹H-NMR-Spektrum von Saponin 1 (90 mg/1 ml Pyridin-d₅)

5.5 Aufklärung von Zuckersequenz, Zuckerverknüpfung und Acetylierungsstellen

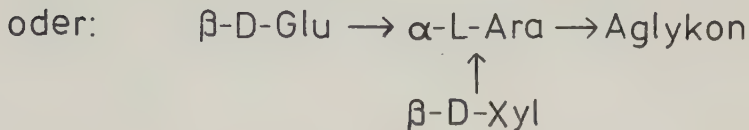
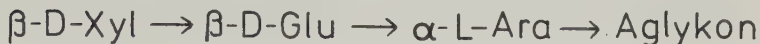
5.5.1 Partialhydrolyse

Um Hinweise auf die Sequenz der Monosaccharide und ihre Verknüpfungsweise im Glykosid zu erhalten, versuchten wir das Saponin partiell hydrolytisch abzubauen. Wir hydrolysierten mit 0.1n-HCl in Dioxan 1 Stde. am Wasserbad nach einer von OTSUKA (42) beschriebenen Methode. Das Hydrolysat wurde dünn-schichtchromatographisch im System Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) aufgetrennt. Da nur Glucose und Xylose nachzuweisen waren, sollte die Arabinose direkt an das Aglykon gebunden sein. Da wegen der Labilität des Aglykons gegenüber Säuren bei der Hydrolyse sehr viele Abbauprodukte bzw. Artefakte entstanden waren, konnte das Monoglykosid zur Weiteruntersuchung präparativ nicht abgetrennt werden. Bei der Partialhydrolyse nach OKABE et al. (43) mit 70%iger Ameisensäure konnten wir nach 1/2 stündiger Reaktionszeit dünn-schichtchromatographisch nur Xylose und wenig Glucose neben zahlreichen anderen Abbauprodukten nachweisen.

Durch eine 15-minütige Hydrolyse mit 2n-Trifluoressigsäure erhielten wir ein Disaccharid von $R_f = 0.28$ im oben genannten Laufmittel. Wir trennten dieses auf Kieselgelplatten im gleichen System ab und hydrolysierten das Eluat mit 2n-Trifluoressigsäure. Das Ergebnis war ein Gemisch von Glucose und Arabinose.

Die Partialhydrolysen lieferten somit folgendes Ergebnis: Xylose muß bei linearer Anordnung der Zucker endständig und Arabinose an das Aglykon gebunden sein. Über die Stellung der Glucose konnten wir nur aussagen, daß sie an die Arabinose gebunden sein mußte.

Somit kamen nur je eine lineare und eine verzweigte Kette in Frage:



5.5.2 Permethylierung und Herstellung der Alditolacetate

Permethylprodukte von Glykosiden ergeben nach Säurespaltung für jeden methylierten Zucker ein oder zwei Paare anomerer Methylglykoside, je nachdem, ob die C-4- oder C-5-OH-Gruppe bzw. beide Positionen unsubstituiert sind. Durch Reduktion zu den Zuckeralkoholen (Alditen) entsteht aus jedem methylierten Zucker ein einziges Derivat, das nach Acetylierung zum Alditolacetat mit Hilfe von GC oder GC-MS identifiziert werden kann. Die Retentionszeiten und MS-Schlüsselfragmente partiell methylierter Alditolacetate finden sich bei BJÖRNDAL u. Mitarb. (44,45) tabellarisch zusammengestellt.

Eine quantitative Permethylierung von Glykosiden wird in der Regel nach KUHN (46) mit Dimethylformamid in Gegenwart von BaO/Ba(OH)₂ oder Ag₂O mit Methyljodid (47,48) oder Dimethylsulfat (49) erreicht. In neuerer Zeit wird bei Saponinen meist die Permethylierungsmethode nach HAKOMORI (50) angewendet. Hierbei entsteht aus NaH und DMSO das Natrium-methylsulfinyl-methid, das über das Carbanion die Hydroxygruppe ionisiert. Die entstandenen Polyalkoxidgruppen setzen sich anschließend schnell mit Methyljodid um. Die Ionisierung der Hydroxygruppen des Glykosids ist eine verhältnismäßig langsame Reaktion. Man läßt deshalb das Glykosid mehrere Stunden mit der Base reagieren, ehe das Methyljodid zugefügt wird.

Das nach der HAKOMORI-Methode erhaltene Permethylierungsprodukt von Saponin 1 lieferte dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten im System Petroläther-Aceton (2:1) mehrere Flecken ohne Überwiegen eines Hauptflecks. Daher wurde das

ungereinigte Methylierungsprodukt direkt weiter zu einem Alditolacetatgemisch weiterverarbeitet.

Auf einer ECNSS-M(3%)-Säule wurden die Alditolacetate gaschromatographisch untersucht. Die Retentionszeiten wurden auf 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-glucit-1,5-diacetat ($R_t = 1.0$) und 2,3,6-Tri-O-methyl-glucit-1,4,5-triacetat ($R_t = 2.5$) als Referenzsubstanzen bezogen. Es wurden im GC im R_t -Bereich von 0 - 2.6 insgesamt 9 Peaks erhalten. Von diesen konnte nur Peak Nr. 4 mit einer Retentionszeit von 0.75 dem 2,3,4-Tri-O-methyl-xylylit-1,5-diacetat aus der endständigen Xylose zugeordnet werden. Die anderen Peaks waren nicht eindeutig zuzuordnen, da die Unterschiede in den Retentionszeiten bei den einzelnen Peaks zu gering waren. Mehr Aufschluß als die vorausgegangene Methode brachte die kombinierte GC-Massenspektroskopie eines in gleicher Weise aufgearbeiteten Alditolacetatgemisches. Gaschromatographisch waren hierbei bei der Untersuchung immerhin drei Hauptpeaks zu erkennen. Die Retentionszeiten waren nicht mit den von BJÖRNDAL (45) angegebenen vergleichbar, da hier mit einer anderen Säulenfüllung gearbeitet wurde. Von den aufgenommenen Massenspektren konnte wieder nur das für die endständige Xylose charakteristische Massenspektrum sicher zugeordnet werden. Es fehlte zwar das Primärfragment von $m/e = 161$, dafür waren die zugehörigen Sekundärfragmente von $m/e = 129$ und 101 vorhanden (Abb. 15).

Wie schon bei BJÖRNDAL (45) beschrieben, ist die Spaltung zwischen zwei benachbarten methoxylierten Kohlenstoffen gegenüber der Spaltung zwischen einem methoxylierten und acetoxylierten Kohlenstoffatom bevorzugt. Aus diesen Primärfragmenten entstehen durch ein- oder mehrmalige Abspaltung von Essigsäure ($m/e = 60$), Keten ($m/e = 42$), Methanol ($m/e = 32$) oder Formaldehyd ($m/e = 30$) die sekundären Fragmente.

Die Interpretation der beiden anderen Massenspektren war zunächst unmöglich, da es keine Vergleichs-Retentionszeiten gab

und die geforderten typischen Primärfragmente nicht alle vorhanden waren. Außerdem war nicht sicher, ob die beiden Acetylgruppen bei der Permethylierung abgespalten worden waren, was eine zusätzliche Schwierigkeit bei der Interpretation bedeutete.

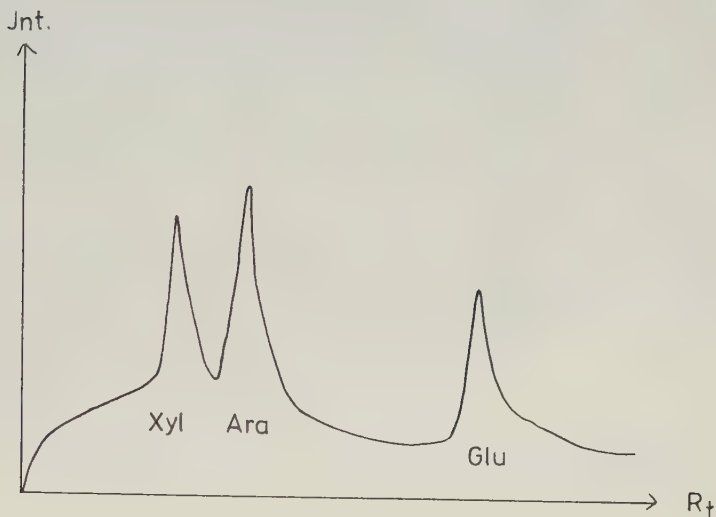


Abb. 14

GC des Alditolacetatgemisches

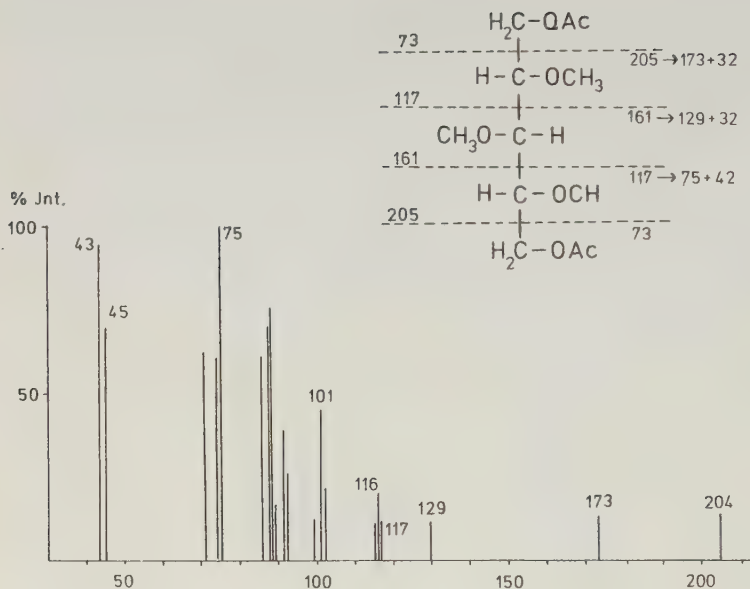


Abb. 15

Massenspektrum von 2,3,4-Tri-O-methyl-xylit-1,5-diacetat

5.5.3 Felddesorptions-Massenspektrum von Saponin 1

Bei der FD-MS werden die Ionen in einem Bereich sehr hoher elektrischer Feldstärke erzeugt. Die Probe wird nicht über die Gasphase in die Ionisierungszone zugeführt. Sie ist zu Beginn der Analyse auf der Emitteroberfläche adsorbiert. Bei FD entfällt demnach ein separater Verdampfungsprozeß der Probe, wodurch ein thermischer Zerfall der Probenmoleküle vor der Ionisierung weitgehend unterdrückt wird.

Die Ionen werden bei der Felddesorption vorwiegend im Kontakt mit der Oberfläche gebildet. Dabei entstehen Ionen sowohl durch das hohe elektrische Feld, als auch durch feldinduzierte Oberflächenreaktionen, vor allem durch Anlagerung von Kationen; Protonisierungsreaktionen z.B. liefern $[M+H]^+$ -Ionen. Wegen der schonenden Ionisierung direkt aus der festen Phase ist die FD-Technik besonders zur Analyse schwer flüchtiger oder thermisch labiler Substanzen geeignet (51).

Anorganische Verunreinigungen, hauptsächlich Alkalisalze, spielen eine bedeutende Rolle bei der Bildung von Ionen. Wenn in der Probe auch nur geringste Mengen an Natrium- und Kaliumionen nachweisbar sind, zeigen sich im FD-Spektrum vorwiegend Kation-Komplex-Signale $[M+Kat]^+$ und geben quasimolekulare Ionen. Diese sind im allgemeinen stabiler als radikalische Molekülonen oder protonierte Moleküle. Daher ist es bei ganz reinen, polaren Verbindungen von Vorteil, für ein FD-Massenspektrum geringe Mengen Alkalisalz zuzugeben. Bei Verbindungen, die aus Pflanzen isoliert werden, stammen die Natriumionen aus den unvermeidlichen Beimengungen der Naturstoffextrakte oder auch aus dem Kieselgel der vorausgegangenen Säulenchromatographie. Einige Arbeiten über Felddesorptions-Massenspektrometrie von Saponinen sind von SCHULTEN et al. (52,53,54) durchgeführt worden. Die FD-MS dient hier nicht nur zur Molekulargewichtsbestimmung, sondern auch zur Strukturaufklärung von polaren, underivatisierten Naturstoffen mit höherem Molekulargewicht. Die Fragmentierung des Saccharidanteils kann hierbei mit der Säurehydrolyse verglichen werden.

Im FD-Spektrum von Saponin 1 war ein $[M+Na]^+$ -Peak bei m/z 1005 zu erkennen, was einem Molekulargewicht von 982 entsprach. Abspaltung von Wasser führte zu $[(M+Na)-H_2O]^+$ mit $m/z = 987$. Hiervon spaltet eine Pentose ab und ergab den sehr intensiven $[(M+Na+H)-132]^+$ -Peak mit $m/z = 855$.

Weitere Abspaltungen von Bruchstücken mit 204 und 174 Masseneinheiten zeigten, daß die beiden Acetylgruppen an die Glucose und die geringegebundene Arabinose geknüpft sein mußten.

Nicht ersichtlich war aus diesem Spektrum, ob die Xylose an die Arabinose oder die Glucose gebunden, die Zuckerkette also linear oder verzweigt angeordnet war.

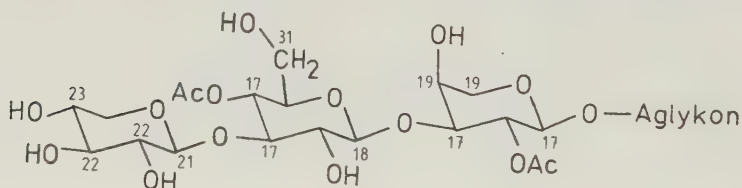
5.5.4 Spin-Gitter-Relaxationszeitmessung von Saponin 1

Da die ^{13}C -Daten der Zuckersignale mit den in der Literatur für Arabinose, Glucose und Xylose angegebenen nicht übereinstimmen, wurden zur genaueren Strukturaufklärung die ^{13}C -Relaxationszeiten gemessen. Die Spin-Gitter-Relaxationszeiten T_1 spiegeln das Beweglichkeitsverhalten der Moleküle in Lösung wieder. Wegen der größten Beweglichkeit des endständigen Zuckers sollte dieser die höchsten NT_1 -Werte⁺⁾ besitzen, der geninständige die niedrigsten.

+) $T_1 = \frac{\text{const.}}{N}$, N = Anzahl der an diesem C-Atom gebundenen Protonen

NESZMELYI et al. (55) fanden bei k-Strophanthosid für die geninständige Cymarose durchschnittliche NT_1 -Werte von 0.19, für die mittelständige Glucose $NT_1 = 0.24$ und für die endständige Glucose $NT_1 = 0.34$.

Bei Saponin 1 war das Ergebnis der Spin-Gitter-Relaxationszeitmessung nicht so eindeutig, d.h. die NT_1 -Werte der Zucker unterschieden sich nicht so deutlich. Zwar hatte die endständige Xylose die höchsten Werte ($NT_1 = 0.22$), die NT_1 -Werte von Glucose und Arabinose waren aber mit 0.18 gleich. Andererseits war hiermit ausgeschlossen, daß die Glucose endständig gebunden war. Daher müssen die Zucker linear angeordnet sein.



24.16 MHz, 90 mg/1 ml Pyridin- d_5
 NT_1 -Relaxationszeiten in 1/100 sec

5.5.5 ^{13}C -NMR-Spektrum von entacetyliertem Saponin 1

Solange die Verknüpfungsweise der Zucker untereinander noch nicht geklärt war, konnte eine Zuordnung der ^{13}C -Signale für den Zuckerbereich nicht getroffen werden. Die Interpretation gelang erst, nachdem gesichert war, daß die Zucker linear angeordnet und welche OH-Gruppen glykosidiert waren. Die lineare Anordnung war aus den Werten der Relaxationszeitmessung abgeleitet worden (siehe oben). Damit konnten auch die Verknüpfungsstellen aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum der entacetylierten Verbindung abgeleitet werden.

Hierzu lösten wir Saponin 1 in Methanol p.a. und gaben einige Tropfen einer 1%igen Natriummethylatlösung zu. Nach Rühren über Nacht bei 50°C neutralisierten wir die Lösung mit Dowex 50W-X8 und engten das Filtrat vollkommen ein. Die im Hochvakuum getrocknete Verbindung zeigte im IR-Spektrum praktisch keine Acetyl-Ester-Bande mehr.

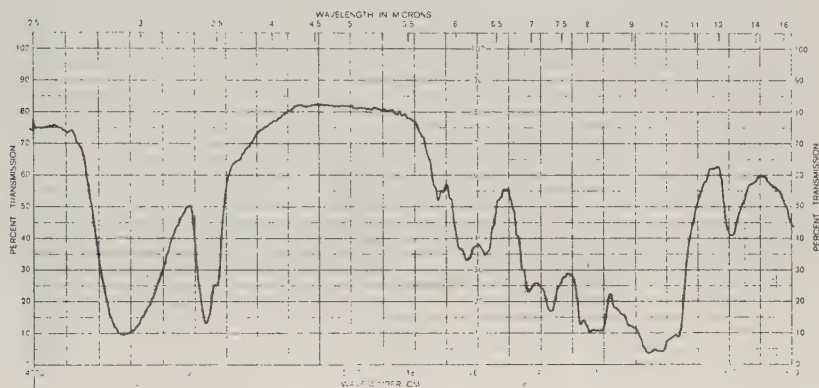


Abb. 17

IR-Spektrum des entacetylierten Saponin 1

Im ^{13}C -NMR-Spektrum der gleichen Verbindung fehlten ebenfalls die für eine Acetylgruppe typischen Signale. Die δ -Werte des Aglykons hatten sich bei einigen Signalen unbedeutend (< 1 ppm) verändert, was mit meßtechnischen Ungenauigkeiten erklärt werden kann.

Die Zuordnung der Zuckersignale erfolgte durch Vergleich mit den Literaturangaben für Methyl-Arabinose, Methyl-Glucose und Methyl-Xylose (56,57,58) bzw. Werten, die von anderen Saponinen mit ähnlicher Zuckerzusammensetzung erhalten wurden (59,60,61, 62,63,64).

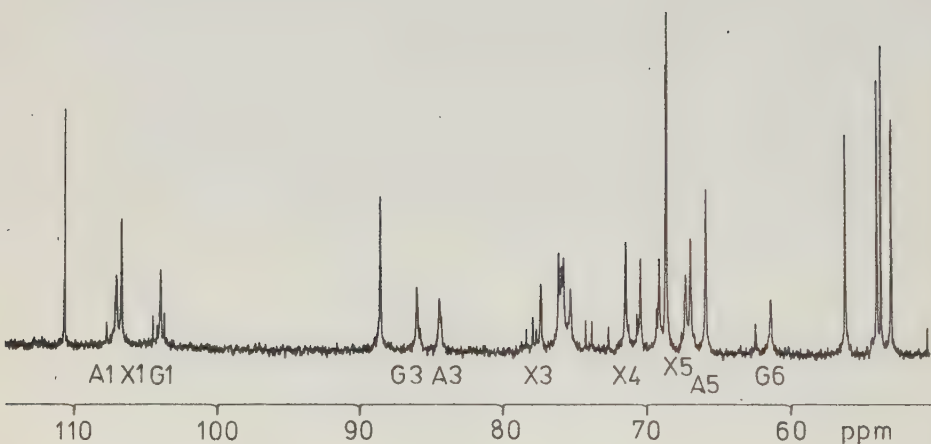


Abb. 18

^{13}C -NMR-Spektrum von entacetyliertem Saponin 1 in Pyridin- d_5
Zuckerbereich (Protonen-breitbandentkoppelt)

Da im off-resonance-Spektrum alle anomeren Kohlenstoffatome eine Kopplungskonstante von $J = 160$ Hz aufwiesen, mußten alle Zucker äquatorial verknüpft vorliegen, d.h. Arabinose als α -Zucker, und Glucose und Xylose als β -Zucker. Auch die chemische Verschiebung bewies dies, da anomere C-Atome mit axialer Verknüpfungsweise im allgemeinen bei höherem Feld (100 - 103 ppm) erscheinen.

Die endständige Xylose war bereits durch Partialhydrolyse und FD-MS bestimmt worden, so daß die zugehörigen ^{13}C -Signale zugeordnet werden konnten.

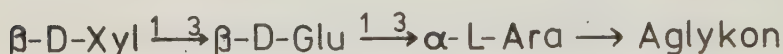
Eine Glykosidierung der Xylose am C-6 der Glucose schied wegen des bei $\delta = 61.4$ ppm liegenden Signals aus. Dasselbe galt für eine Verknüpfung an der C-4-OH-gruppe, denn das bei $\delta = 70.4$ ppm liegende Signal für das C-4 war nicht verschoben. Eine Glykosidierung am C-2 der Glucose hätte eine Verschiebung des Signals nach $\delta = 82 - 83$ ppm verursacht. Da in diesem Bereich kein Signal vorhanden war, kam für Saponin 1 nur eine Verknüpfung am C-3-OH der Glucose in Frage. Die Verschiebung dieses Signals um ca. 9 - 10 ppm nach tieferem Feld gegenüber einer unsubstituierten Glucose ist in der Literatur als üblicher Glykosidierungs-shift beschrieben. Das Signal bei 84.3 ppm zeigte die Glykosidierung der Arabinose an der C-3-OH-Gruppe an. Leicht zuzuordnen waren durch Vergleich auch die Signale bei $\delta = 69.1$ und 66.9 ppm (C-4 und C-5) der Arabinose. Eine gewisse Unsicherheit in der Zuordnung betraf das Signal bei $\delta = 75.2$ ppm, das von dem C-2 der Arabinose stammen sollte. Es müßte bei höherem Feld erscheinen. Diese Abweichung konnte von uns nicht geklärt werden.

In Tabelle 2, S. 44, sind die ^{13}C -NMR-Daten der Zucker aufgeführt und zugeordnet. In Klammern sind zum Vergleich die Daten der zugehörigen Methylzucker aufgelistet (57).

Tabelle 2: ^{13}C -NMR-Daten von Saponin 1 entacetyliert, Zuckerbereich (Pyridin- d_5)

	Arabinose	Glucose	Xylose (ppm)
C-1	106.9 (105.9)	103.9 (105.4)	106.6 (106.1)
C-2	75.2 (72.2)	75.8 (74.8)	75.7 (74.6)
C-3	84.3 (74.4)	85.9 (78.1)	77.3 (78.1)
C-4	69.1 (69.1)	70.4 (71.4)	71.4 (70.8)
C-5	66.9 (66.6)	76.0 (78.1)	67.2 (66.9)
C-6		61.4 (62.5)	

Daraus ergibt sich folgende Verknüpfung:



5.5.6 ^{13}C -NMR von Saponin 1 (Zuckerbereich)

Nachdem die Verknüpfung der Zucker feststand, konnten wir auch die Acetylierungsstellen bestimmen.

In der Literatur (40,60,65,66,67,68) wird beschrieben, daß das ipso-C-Atom durch eine Acetylierung um 1 - 2 ppm nach tieferem Feld, die beiden der Acetylgruppe benachbarten C-Atome dagegen um 2 - 3 ppm nach höherem Feld verschoben werden. Der Einfluß auf die γ -C-Atome ist so gering, daß er vernachlässigt werden kann.

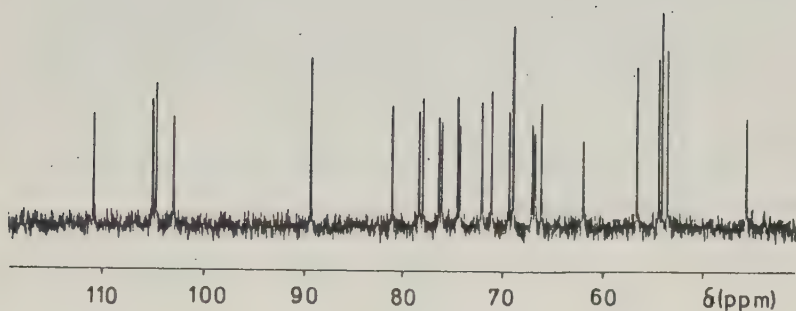


Abb. 19

¹³C-NMR-Spektrum von Saponin 1 in Pyridin-d₅
Zuckerbereich (Protonen-breitbandentkoppelt)

Die Tieffeld-Verschiebung des ipso-C-Atoms der Glucose durch Acetylierung liegt mit 1.6 ppm durchaus im Bereich der bisher gemessenen Werte. Auch das Signal bei $\delta = 76.3$ ppm für das C-2 der Arabinose ist durch den Acetylierungs-shift von 1.1 ppm gegenüber der entacetylierten Verbindung erklärt.

Die Verschiebung der beiden β -Kohlenstoffatome zu den Acetylierungsstellen (C-3 von Glu und Ara) um 5 bzw. 5.9 ppm nach höherem Feld war allerdings größer als erwartet.

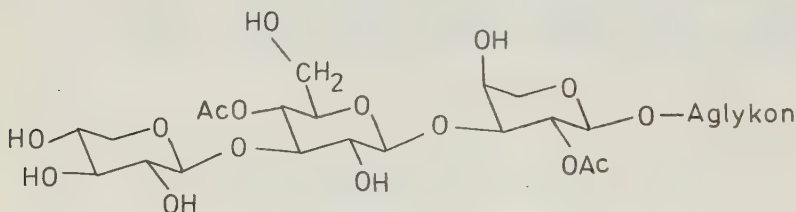
Im Platycodin C (69), einem Triterpensaponin vom Oleanen-Typ wurde allerdings für das C-4 (β)-Atom der Rhamnose ein Acetylierungs-shift von 6.2 ppm gemessen. Auch bei einem Dammaran-Saponin aus *Panax pseudo-ginseng* (40) wurde für das C-5-Atom

der am C-6-OH acetylierten Glucose eine Verschiebung von 4.2 ppr gefunden.

Bei Platycodin C wurde außerdem ein Einfluß der Acetylgruppe auf das C-1-Atom der am C-4-OH der Rhamncse gebundenen Xylose beobachtet. Diesen Einfluß konnten wir auch bei der Xylose von Saponin 1 beobachten, denn das Signal des anomeren C-Atoms war um 1.7 ppm nach höherem Feld verschoben, ohne daß eine Acetylgruppe an der benachbarten C-OH-Gruppe gebunden war.

Die Verschiebung des anomeren C-Atoms der Arabinose um 2.3 ppm gegenüber der entacetylierten Verbindung nach höherem Feld machte nochmals die Acetylierung am C-2-OH deutlich.

Daraus ergibt sich für Saponin 1 nachstehende Trisaccharidstruktur:



Die ^{13}C -NMR-Daten sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Die Werte in Klammern stellen die Daten der entacetylierten Verbindung dar.

Tabelle 3: ^{13}C -NMR-Daten von Saponin 1 (Zuckerbereich) i. Pyridin- d_6

	Arabinose	Glucose	Xylose (ppm)
C-1	104.6 (106.9)	102.9 (103.9)	104.9 (106.6)
C-2	76.3 (75.2)	76.1 (75.7)	74.4 (75.8)
C-3	78.4 (84.3)	80.9 (85.9)	77.9 (77.3)
C-4	69.2 (69.1)	72.0 (70.4)	71.0 (71.4)
C-5	66.7 (66.9)	74.2 (76.0)	66.9 (67.2)
C-6		61.9 (61.4)	

6.0 Strukturaufklärung von Saponin 2

Wie bei Saponin 1 wurde die Hydrolyse mit Trifluoressigsäure vorgenommen. Die DC-Analyse in den dort angegebenen Laufmitteln ergab ebenfalls Arabinose, Glucose und Xylose. Durch Bestimmung im Zuckeranalysator wurde ebenfalls ein Arabinose-, Glucose- und Xylose-Mol-Verhältnis von 1:1:1 ermittelt.

Im IR-Spektrum war die bei Saponin 1 stark ausgeprägte Ester-carbonylbande bei 1750 cm^{-1} nur schwach angedeutet. Das Vorhandensein eines Acetylrestes war aber aus der starken asymmetrischen C-O-Valenzschwingung bei 1240 cm^{-1} (37) ersichtlich. Möglicherweise war im Saponin 2 nur ein Acetylrest im Molekül vorhanden.

Das Protonen-breitbandenkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum von Saponin 2 zeigte 48 Kohlenstoffatome, von denen 16 den Zuckern zugeordnet werden konnten. Es war nur ein Signal für das Carbonyl-C-Atom des Acetylrestes vorhanden. Die dem Aglykon zugehörigen C-Signale waren um max. 0.5 ppm gegenüber denen von Saponin 1 verschoben (siehe Tabelle 4, S. 48). Die Multiplizitäten im off-resonance-Spektrum stimmten mit denen von Saponin 1 praktisch überein.

Tabelle 4: ^{13}C -NMR-Daten für das SaponinGrundgerüst von Saponin 2 (Pyridin- d_5). In Klammern entsprechende Werte von Saponin 1.

(ppm)	Zuordnung	(ppm)	Zuordnung
169.7 (169.9)	Acetyl	37.0 (36.9)	C-10
134.0 (134.0)	C-25	36.9 (36.8)	C-13
127.0 (126.8)	C-24	36.6 (36.5)	C-7
110.4 (110.4)	C-16	35.9 (35.7)	C-15
88.7 (88.6)	C-3	29.8 (29.7)	C-21
68.4 (68.4)	C-20	28.2 (28.2)	C-12
68.3 (68.2)	C-23	27.5 (27.4)	C-28
65.6 (65.5)	C-30	26.3 (26.2)	C-2
55.8 (55.7)	C-5	25.3 (25.3)	C-26
53.8 (53.6)	C-17	21.5 (21.5)	C-11
53.5 (53.4)	C-14	18.6 (18.5)	C-27
52.8 (52.7)	C-9	18.0 (18.5)	C-18
45.2 (45.1)	C-22	18.0 (18.0)	C-6
39.2 (39.0)	C-4	16.2 (16.1)	C-19
38.3 (38.2)	C-1	16.0 (15.9)	C-29
37.3 (37.2)	C-8		

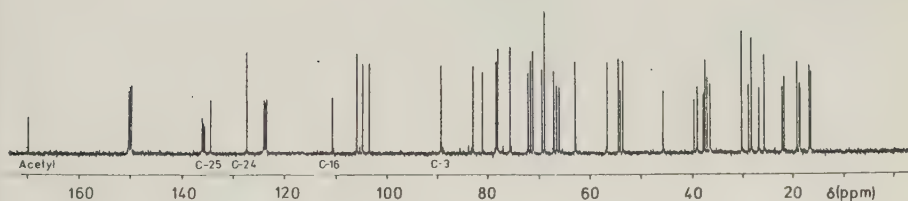
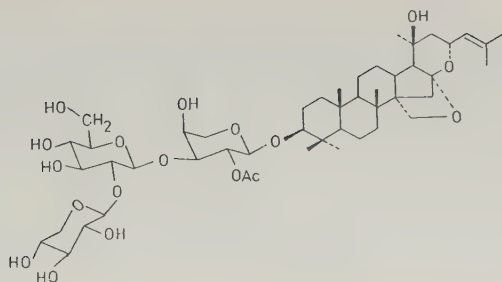


Abb. 20

100.62 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum von Saponin 2 (40 mg/1 ml Pyridin- d_5)

Im Hochfeld- ^1H -NMR-Spektrum war das Signal einer Acetylgruppe als Singulett bei 2,29 ppm zu erkennen. Die Protonen an C-18, C-19, C-28 und C-29 waren gegenüber Saponin 1 etwas nach höherem Feld verschoben. Geringere Unterschiede (max. 0,4 ppm) zeigten sich bei den C-21-, C-26- und C-27-Methylgruppen.

Die anomeren Protonen hatten alle die gleiche Kopplungskonstante von $J = 7.5$ Hz, erschienen aber gegenüber Saponin 1 paramagnetisch verschoben. Das Proton am C-23 trat übereinstimmend mit Saponin 1 bei $\delta = 5.14$ ppm in Erscheinung. Das Doppeldublett bei $\delta = 5.87$ ppm konnten wir als das Zuckerproton an der O-Acetyl-Gruppe zuordnen.

Somit ist Saponin 2 im Aglykonteil identisch mit Saponin 1. Im Zuckerbereich unterscheidet es sich zumindest durch das Fehlen eines Acetylrestes. Über Sequenz und Verknüpfung der Zucker konnte aus diesem Spektrum vorerst nichts ausgesagt werden.

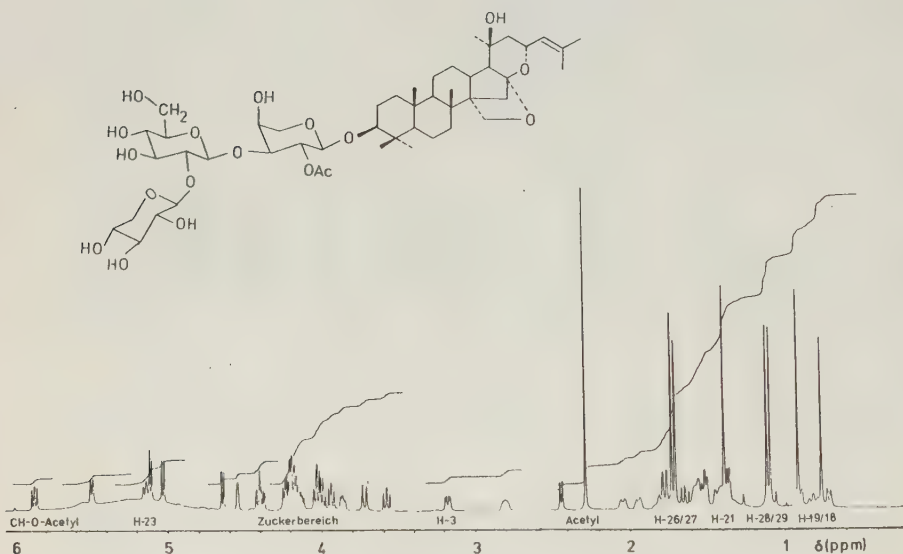
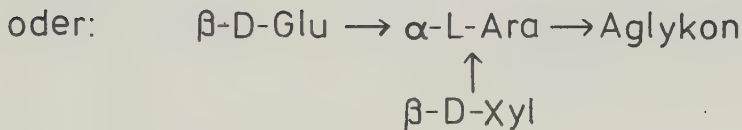


Abb. 21

500 MHz ^1H -NMR-Spektrum von Saponin 2 (40 mg/ 1 ml Pyridin- d_5)

Da nach kurzer Säurehydrolyse mit 2n-Trifluoressigsäure Xylose und Glucose und erst nach längerer Hydrolyse Arabinose nachweisbar waren, bestanden wie bei Saponin 1 die folgenden zwei Sequenzmöglichkeiten:



Die Permethylierung bei Saponin 2 lieferte dünnschichtchromatographisch ebenfalls mehrere Produkte. Nach GC-Auftrennung des Methylzuckeraltitolacetatgemisches erhielten wir keine interpretierbaren Peaks. Wir versuchten daher die weitere Strukturaufklärung über das Saponin-Peracetat, da sich diese besser zur Massenspektroskopie der Zucker eignen. Z.B. gelingt hiermit im allgemeinen auf Grund charakteristischer Fragmentierungs-Sequenzen die Unterscheidung glykosidisch gebundener Hexosen und Pentosen. Neben den Monosaccharidbestandteilen sind in den Peracetat-Glykosid-Spektren auch die Disaccharidanteile gut ausgeprägt.

Die Acetylierung erfolgte mit Pyridin-Acetanhydrid bei Raumtemperatur. Die für eine endständige Xylose typischen Fragmente von 259, 217, 199, 175 und 97 ME waren vorhanden. Ein bei der Masse 331 auftretender Peak könnte auch aus einer endständigen Glucose stammen, obwohl das starke Fragmentation bei 547 eindeutig für ein Xylose-Glucose-Fragment mit endständiger Xylose sprach. Das Ziel, aus dem Fragmentierungsmuster die Zuckersequenz abzulesen bzw. zu entscheiden, ob ein linearer oder verzweigt-kettiger Aufbau vorlag, gelang auch hiermit nicht.

Einige weitere Informationen brachte das FD-Massenspektrum. Der erhaltene Molekülpeak $[M+Na]^+$ von 921 sprach für ein MG von 898. Außerdem war eindeutig die Abspaltung einer Pentose, einer Hexose und noch einer Pentose zu erkennen. Da nach dem ^{13}C -Spektrum noch eine Acetylgruppe im Molekül enthalten sein sollte, wiederholten wir die Messung des FD-Spektrums diesmal unter geringerer thermischer Belastung. In diesem Spektrum fanden wir neben dem m/z 921-Ion noch einen um 42 Einheiten höheren Peak bei $m/z = 962$. Daraus war zu folgern, daß der Peak bei 921 dem $[(M+Na)-Acetyl]^+$ -Ion zukommt und das Saponin 2 somit eine Acetylgruppe enthält. Allerdings konnte im Spektrum keine Abspaltung eines Acetylzuckers beobachtet werden. Es war somit nicht möglich, anzugeben, welcher Zucker ursprünglich acetyliert war.

In Abb. 22 ist das bei höherer thermischer Belastung aufgenommene FD-MS gezeigt.

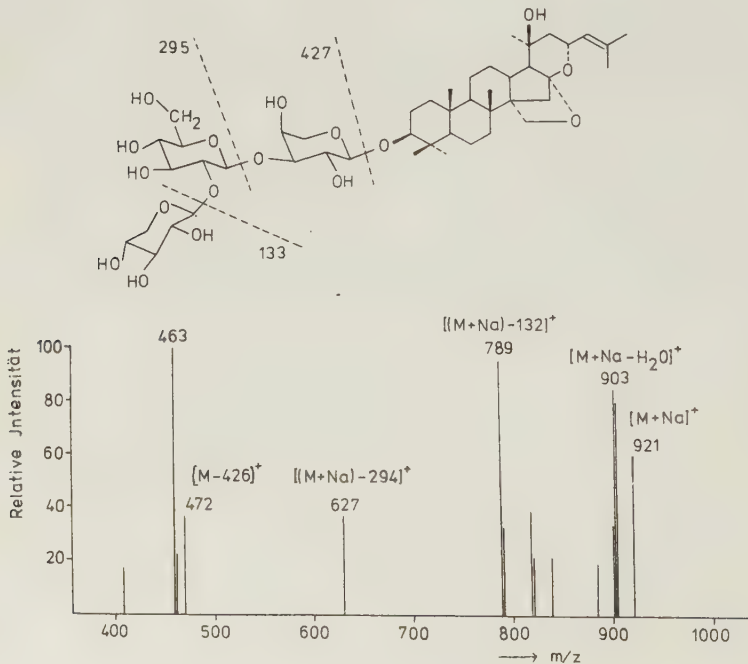
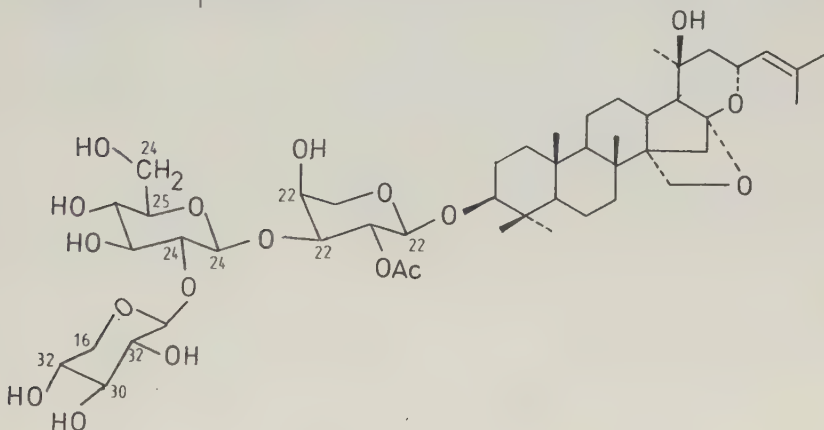


Abb. 22: FD-MS von Saponin 2

Die Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeiten zeigte auch bei Saponin 2 eine lineare Anordnung der Zucker. Dies drückte sich in den unterschiedlichen Relaxationszeiten T_1 für alle Zucker-Kohlenstoffe aus. Bei einer verzweigten Zuckerverknüpfung wären für Xylose und Glucose etwa gleichgroße Relaxationszeiten zu erwarten gewesen. Die durchschnittlichen Relaxationszeiten der Xylose betrugen 0,31, die der Glucose 0,24. Arabinose zeigte Werte von $NT_1 = 0,22$.



Relaxationszeiten von Saponin 2 (^{13}C - T_1 - 1/100 sec)
25.16 MHz-Spektrum (35 mg/0.15 ml, Pyridin- d_5 , $t = 90^\circ\text{C}$)

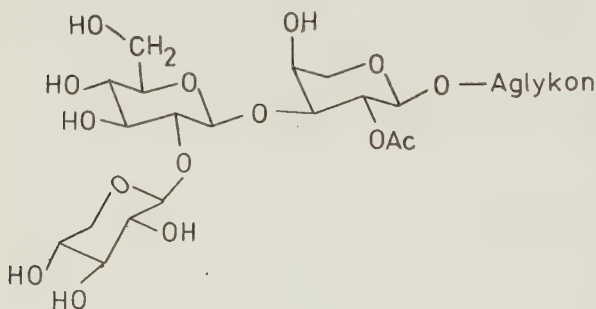
Die Zuordnung der ^{13}C -Signale für den Zuckerbereich bereitete auch bei Saponin 2 Schwierigkeiten. Da wir mit Hilfe der vorher beschriebenen, spektroskopischen Methoden nicht erkennen konnten, welcher Zucker acetyliert war, versuchten wir zuerst das ^{13}C -NMR-Spektrum der entacetylierten Verbindung zu interpretieren. Da durch Relaxationszeitmessung die lineare Anordnung der Zucker bewiesen war, mußte die Xylose endständig, die Glucose mittelständig und die Arabinose an das Genin gebunden sein. Alle Zucker mußten äquatorial verknüpft sein, da die Kopplungskonstanten der anomeren Kohlenstoffatome übereinstimmend 160 Hz betrugen.

Die Zuordnung der einzelnen Signale erfolgte durch Vergleich mit denen von Saponin 1.

Das Signal bei 85.7 ppm entsprach dem C-3 der Arabinose. Ein zweites unmittelbar daneben liegendes Signal bei 85.4 ppm sollte von dem C-2 der Glucose stammen, das aber aus vorerst nicht erklärbaren Gründen nach zu tiefem Feld verschoben war. Im ^{13}C -Spektrum der genuinen Verbindung lag das entsprechende Signal bei 83.0 ppm, wo man es normalerweise in anderen Glucose-haltigen Sacchariden findet.

Die Verschiebung des C-3 der Arabinose um 4.4 ppm entspricht dem bei Saponin 1 beschriebenen Acetylierungs-shift. Eigenartigerweise war das ipso-C-Atom durch die Acetylgruppe nur um 0.1 ppm verschoben. Von dieser Anomalie abgesehen kann man daher mit großer Wahrscheinlichkeit folgern, daß eine Acetylgruppe an das C-2-OH der Arabinose gebunden ist.

Für Saponin 2 ergibt sich damit folgende Zuckerverknüpfung:



In Tabelle 5 sind die ^{13}C -Daten von Saponin 2 aufgeführt. In Klammern erscheinen die entsprechenden Daten der entacetylierten Verbindung.

Tabelle 5: ^{13}C -NMR-Daten von Saponin 2, Zuckerbereich (Pyridin-d_5)

	Arabinose	Glucose	Xylose
C-1	104.8 (107.4)	103.6 (104.0)	106.2 (106.5)
C-2	71.3 (71.4)	83.0 (85.4)	75.7 (75.9)
C-3	81.3 (85.7)	78.1 (77.7)	78.2 (78.1)
C-4	69.1 (68.9)	70.8 (70.5)	70.8 (71.4)
C-5	66.4 (66.3)	77.9 (77.5)	67.0 (66.7)
C-6		62.3 (62.5)	

Damit unterscheidet sich Saponin 2 von Saponin 1 durch das Fehlen einer Acetylgruppe und durch eine andere Zuckerverknüpfung. Die Xylose ist bei Saponin 2 an C-2-OH, bei Saponin 1 an C-3-OH der Glucose gebunden.

Schwer erklärbar ist aber das R_f -Verhalten beider Verbindungen. Saponin 1 besitzt, obwohl es zwei Acetylgruppen im Zuckeranteil enthält, einen niedrigeren R_f -Wert als das Saponin 2 mit einer Acetylgruppe. Das Umgekehrte wäre zu erwarten gewesen.

Ungewöhnlich sind vor allem die nahe beieinander liegenden R_f -Werte von Saponin 1 mit drei Zuckern und zwei Acetylgruppen und Hovenosid D, das fünf Zucker enthält.

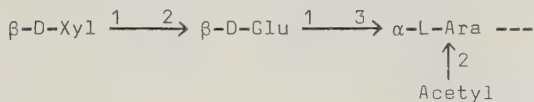
DC-Verhalten der Saponine

Adsorbens: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

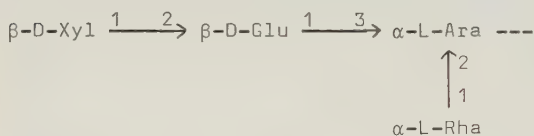
Fließmittel: Chloroform-Methanol-n-Propanol-Wasser (45:60:5:40)
(Unterphase)

Detektion: Komarowsky-Reagens

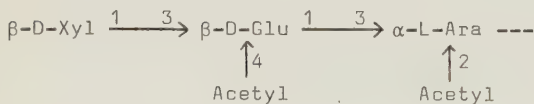
Saponin 2: $R_f = 0.35$



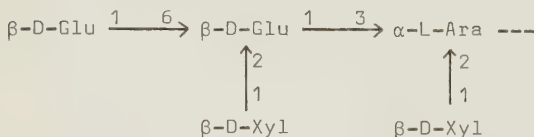
Jujubosid B: $R_f = 0.26$



Saponin 1: $R_f = 0.18$



Hovenosid D: $R_f = 0.14$



C. Pharmakologische Untersuchungen

In der Rhamnaceenfamilie gibt es, wie aus früheren Kapiteln ersichtlich ist, eine Reihe von Pflanzenarten, die ebenfalls Saponine vom Ebelinlacton-Typ enthalten. Eine von diesen, *Zizyphus jujuba*, liefert eine Samendroge, die in der chinesischen Medizin schon seit dem Altertum in der Volksmedizin als Sedativum und Nervenstärkungsmittel bei physischer und geistiger Erschöpfung verwendet wurde. In einer pharmakologischen Untersuchung wurde von WATANABE (70) zwar nicht eindeutig geklärt, ob diese sedierende Wirkung einem definiertem Saponin, etwa dem Jujubosid A oder B zukommt, doch enthielt die wirksame Fraktion neben Phenolglykosiden hauptsächlich Saponine. In der Zwischenzeit berichtete WOO (71), daß den aus *Zizyphus jujuba* isolierten Flavon-C-Glykosiden Spinosin und Swertisin eine sedierende Wirkung zukommt. Die eben wirksamen Konzentrationen lagen aber mit 100 - 200 mg/kg so hoch, daß diese, wenn überhaupt, nur zu einem geringen Teil an der pharmakologischen Gesamtwirkung der Droge beteiligt sein können. Bei anderen Testen wurde mit 500 mg/kg und 1 g/kg Spinosin und Swertisin gearbeitet, wobei sich Swertisin als stärker wirksam erwies.

1. Direkte Bestimmung der Spontanmotilität

Wir führten daher mit Saponinfraktionen und den beiden rein isolierten Saponinen von *Colubrina asiatica* einen Motilitätstest an Mäusen im Lichtschrankenkäfig durch, wie er z.B. von SCHÄETTE (72) und später von JURČIC (73) zur Prüfung von Baldrianzubereitungen verwendet worden war. Hiermit kann die motorische Aktivität bei Mäusen quantitativ erfaßt werden. Pharmaka, die die Aktivität des "Aktivierungszentrums" in der *Formatio reticularis* vermindern, wirken sedativ und hypnotisch (74). Dabei ist der Unterschied zwischen sedativer und hypnotischer Wirkung nicht qualitativer, sondern quantitativer Natur.

In einem Vorversuch wurde morgens die Spontanmotilität von je 10 Mäusen im Testkäfig 2 Stdn. lang alle 30 min gemessen. 24 Stdn. später applizierten wir den gleichen Tieren zur gleichen Tageszeit in Wasser oder Propylenglykol gelösten Extrakt oder Saponine mit Hilfe einer Schlundsonde 30 min vor Versuchsbeginn. Die Bewegungsimpulse wurden analog zum Vorversuch gemessen.

Die Wirkungswerte ergaben sich aus dem Quotient der zu testenden Substanzen zu der Impulszahl des Kontrollversuches 24 Stdn. zuvor. Nach dieser Definition bedeuten Wirkungsquotienten von $W < 1$ eine Sedierung, von $W > 1$ ein Excitation und $W = 1.0$ keine Wirkung. Zunächst prüften wir eine Butanolausschüttelung aus dem Gesamtextrakt und ein stärker angereichertes Saponingemisch. Während der Butanolauszug erst bei 100 mg/kg mit $W = 0.69$ eine deutliche Motilitätssenkung ergab, hatte das Saponingemisch bereits bei 0.1 mg/kg, besser bei 1 und 10 mg entsprechende Wirkungsquotienten von 0.39 - 0.65.

Die reinen Saponine 1 und 2 hatten bereits bei einer Konzentration von 0.1 bis 1 mg/kg eine starke sedativ-tranquillisierende Wirkung. Die Wirkungsquotienten lagen bei 0.38 bis 0.74. Saponin 1 hatte die stärkste Wirkung.

Zum Vergleich wurden auch von den Saponinen Jujubosid B und Hovenosid G die Aktivitäten bestimmt. Die letzten beiden Saponine sind, wie aus Abb. 23, S. 59, ersichtlich, sedativ nicht so stark wirksam. Sie erreichen nur 1/4 bzw. 1/3 der sedativen Aktivität von Saponin 1. Die Wirksamkeit von Saponin 2 war nach 30 min ebenfalls um die Hälfte geringer als die von Saponin 1, wurde aber innerhalb der nächsten 90 min etwas stärker als die Vergleichssubstanzen.

Eine von SCHÄETTE getestete Valepotriate-Mischung (72) hatte in der gleichen Konzentration (1 mg/kg) etwa die gleiche Wirkung wie Saponin 2. Saponin 1 war in dieser Konzentration sogar noch stärker wirksam als die Substanzmischung.

Saponin 2 zeigte außerdem noch eine stark diuretische Wirkung, die bei Saponin 1 nicht nachzuweisen war. Die vielen Saponinen zukommende diuretische Wirkung könnte nach TSCHESCHE (22) auf eine Reizung der Nierenepithelien zurückgehen.

Anschließend wurde unter den gleichen Bedingungen getestet, ob auch andere bekannte Saponine eine sedativ-tranquillisierende Wirkung besitzen, obwohl dies bisher in der Literatur nicht beschrieben worden war. Geprüft wurde ein Saponingemisch aus *Primula veris* und das Saponingemisch aus *Saponaria alba* (Merck). Wie aus Tabelle 6, S. 60, hervorgeht, besitzen *Primulasaponine* bei einer Konzentration von 10 mg/kg praktisch keine, *Saponaria-Saponine* bei 10 mg/kg eine Wirksamkeit mit einem WQ von nur 0.6 bis 0.8. Bei einer Gabe von 1 mg/kg ist praktisch keine sedierende Aktivität mehr festzustellen.

Daraus geht hervor, daß eine Strukturwirkungsspezifität vorzuliegen scheint. Ob die sedierende Wirkung dem Aglykon oder den Glykosiden zukommt, konnte nicht entschieden werden.

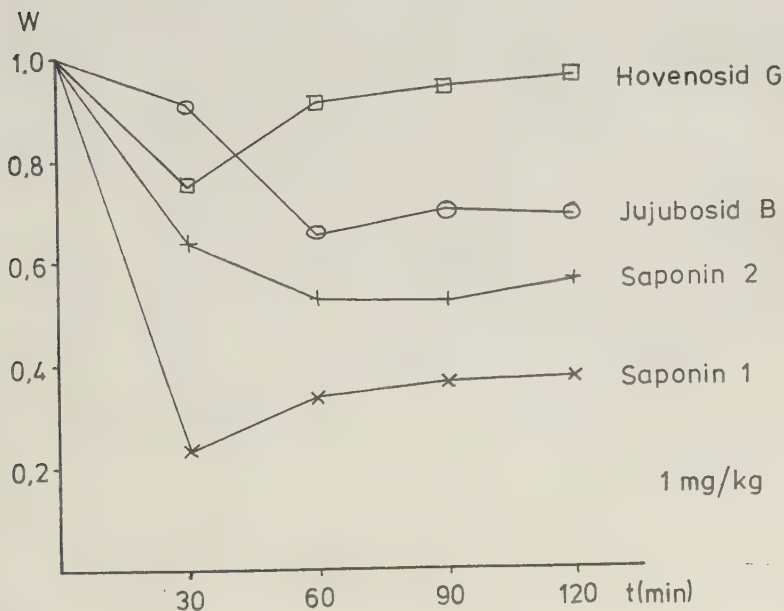


Abb. 23

Tabelle 6: Spontanmotilität von Mäusen, gemessen im Lichtschranken-
käfig

Substanz	Dosis mg/kg	Wirkungsquotient nach			
		30 min	60 min	90 min	120 min
Butanolausschüttelung	100	0.96	0.95	0.93	0.93
aus Gesamtextrakt	10	0.82	0.69	0.70	0.69
Saponingemisch	100	0.63	0.62	0.57	0.65
1 + 2	10	0.36	0.35	0.51	0.52
(noch verunreinigt)	1	0.31	0.35	0.38	0.39
	0.1	0.47	0.52	0.56	0.63
Saponin 1	1	0.23	0.33	0.36	0.38
	0.1	0.38	0.43	0.53	0.55
	0.01	0.80	0.59	0.66	0.82
Saponin 2	10	1.09	0.77	0.75	0.74
	1	0.64	0.53	0.51	0.59
	0.1	0.77	0.70	0.69	0.74
Hovenosid G	1	0.75	0.91	0.93	0.96
	0.1	0.82	0.89	0.96	0.98
Jujubosid B	10	0.52	0.42	0.46	0.39
	1	0.92	0.65	0.69	0.66
Saponin-Gemisch	10	0.83	0.58	0.62	0.70
(Merck) aus	1	0.95	1.01	0.96	0.97
Saponaria alba					
Primula-Saponine	10	0.90	0.98	1.01	0.99

2. Bestimmung der Barbiturat-Narkoseverlängerung

Zur Testung der Wirksamkeit von Sedativa benutzt man neben der Hemmung der spontanen Motilität den Versuch der Narkosepotenzierung. Geprüft wird hiermit, ob eine Substanz zu einer Verlängerung oder Vertiefung einer Narkose führt.

Wir wählten die Versuchsanordnung nach MEYER (75). Als Schlafmittel wurde Hexobarbital-Natrium in einer Dosierung von 70 mg/kg verwendet. Als Kriterium der Narkosedauer gilt die Zeitdauer der Seitenlage, vom Beginn bis zum Auftreten von Halte- und Stellreflexen. Sie betrug bei 70 mg/kg Hexobarbital-Natrium i.p. 41.2 ± 6.1 min. Bei oraler Gabe von Saponin 1 30 min vor der Hexobarbitalinjektion verlängerte sich die Narkose bei der Dosis von 1 mg/kg auf 49.6 ± 5.4 min und bei 10 mg/kg auf 96.5 ± 5.1 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6 Messungen.

Diese Interaktion mit dem zentralwirksamen Narkotikum bestätigt die sedativ-tranquillisierende Wirkung des Saponins.

3. Antagonistische und synergistische Wirkung zu Amphetamin bzw.

Chlordiazepoxid

Funktionelle Antagonisten der sedativ-hypnotischen Substanzen sind Amphetamin und seine Analoga.

In einem weiteren Versuch wurde dieser Test nach KUSCHINSKY und Mitarb. (76) dahingehend modifiziert, daß einmal die sedierende Wirkung an Amphetamin-vorbehandelten Tieren, zum anderen eine synergistische Wirkung zu Chlordiazepoxid gemessen wurde.

Die Versuche wurden an je 5 Mäusen morgens zu gleicher Zeit durchgeführt. Die Tiere bekamen Testsubstanzen (Amphetamin 5 mg/kg und Chlordiazepoxid/Librium/ 1 mg/kg) 30 min vor Versuchsbeginn appliziert. Saponin 1 war gut wasserlöslich und konnte in dieser Form gegeben werden. Da Saponin 2 nur in Propylenglykol löslich war, mußte parallel je ein Propylenglykol-Blindversuch durchgeführt werden.

Zunächst wurde die ursprüngliche Motilität der Tiere 2 min nach ihrer Überführung in den Versuchskäfig gemessen. Die Messung erfolgte in der 3. Minute (Vorperiode). Anschließend wurden die Pharmaka i.p. verabreicht und die Motilität nach 30 min in gleicher Weise registriert. Anschließend erfolgte die Applikation von Saponin 1 i.p., die von Saponin 2 und Propylenglykol per os. Von diesem Zeitpunkt an wurde 2 Stdn. lang alle 30 min die Impulsrate 1 min lang bestimmt. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 7 und 8 dargestellt.

Dieser Versuch an mit Amphetamin bzw. Chlordiazepoxid vorbehandelten Tieren bestätigt die Tranquillizer-Wirkung der Colubrina-Saponine. Es ergab sich eine zu Amphetamin antagonistische, zu Chlordiazepoxid synergistische Wirkungsweise. Die Aktivität beider Saponine war in diesem Versuch fast gleich.

4. Akute Toxizitätsprüfung

Um die eventuelle therapeutische Einsatzmöglichkeit zu prüfen, wurde die akute orale Verträglichkeit von Saponin 1 (noch unreinigt) an männlichen NMRI-Mäusen mit einem Körpergewicht von 20 - 30 g bei einmaliger peroraler Applikation an je 5 Tieren geprüft. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere nicht nüchtern. Die Dosis letalis media (LD_{50}) betrug für einen Beobachtungszeitraum bis zu 7 Tagen 2010 (1790 - 2231) mg/kg.

Die therapeutische Breite von Saponin 1 ist somit außerordentlich hoch.

Im Vergleich dazu besitzt das Ginseng-Saponin eine LD_{50} von 765 mg/kg.

Tabelle 7: Ergebnisse von Versuch 4

Vorperiode		1. Versuchsperiode		2. Versuchsperiode			
Aktivität	Behandlung	Aktivität nach 30 min	Behandlung	30	60	90	120 min
147	Amphetamin (5 mg/kg)	264		213	172	140	143
163	Amphetamin 5 mg/kg)	257	Saponin 1 (1 mg/kg)	79	65	61	59
159	Chlor- diazepoxid (1 mg/kg)	106		85	74	69	82
135	Chlor- diazepoxid (1 mg/kg)	98	Saponin 1 (1 mg/kg)	24	21	33	39

Tabelle 8: Ergebnisse von Versuch 4

Vorperiode	1. Versuchsperiode		2. Versuchsperiode			
Aktivität	Behandlung	Aktivität nach 30 min	Behandlung	Aktivität 30 60 90 120 min	Aktivität nach	
148	Amphetamin (5 mg/kg)	281	Propylen- glykol	229 190 132 157	60 90 120 min	
156	Amphetamin (5 mg/kg)	265	Saponin 2 (1 mg/kg)	98 71 56 42		
129	Chlor- diazepoxid (1 mg/kg)	99	Propylen- glykol	91 82 74 69		
141	Chlor- diazepoxid (1 mg/kg)	104	Saponin 2 (1 mg/kg)	41 36 31 26		

Z U S A M M E N F A S S U N G

Aus der Rhamnacee Colubrina asiatica Brongn., einer in tropischen und subtropischen Gebieten heimischen Pflanze, konnten durch Säulenchromatographie an Kieselgel und Sephadex LH 20 sowie "Drop-let counter-current chromatography" zwei Hauptsaponine in reiner Form isoliert werden.

Das Sapogenin, das nach Säurehydrolyse beider Saponine zu erhalten war, wurde durch UV-, IR- und ^1H -NMR-Spektroskopie als Ebelinlacton identifiziert. Das Sapogenin besitzt damit das seltene Dammaran-Grundgerüst. In den genuinen Saponinen liegt es allerdings, wie die Protonen-breitbandentkoppelten und off-resonance- ^{13}C -NMR-Spektren der Saponine zeigten, als 3β , 20S-Dihydroxy-16 β (23R), 16 (30)-dioxidodammar-24-en (Jujubogenin) vor.

Für den Saccharidanteil beider Saponine wurde übereinstimmend ein Arabinose-, Xylose- und Glucose-Mol-Verhältnis von 1:1:1 ermittelt. Beide Saponine liegen als Acylglykoside vor. Saponin 1 enthält zwei Acetylgruppen, während Saponin 2 nur einen Acetylrest trägt. Die Verknüpfungsweise der Zucker untereinander und die Stellung der Acetylreste wurde durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie bestimmt. Demnach handelt es sich bei Saponin 1 um das Jujubogenin-3-O-[2-O-acetyl-3-O-(3-O- β -D-xylopyranosyl-4-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl) α -L-arabinosid] und bei Saponin 2 um das Jujubogenin-3-O-[2-O-acetyl-3-O-(2-O- β -D-xylopyranosyl- β -D-glucopyranosyl) α -L-arabinosid].

Da die mit Colubrina asiatica verwandte und ebenfalls Saponine enthaltende Zizyphus jujuba-Droge in der Volksmedizin als Sedativum Verwendung findet, wurden die isolierten Saponine von Colubrina in mehreren Tier-Versuchsmodellen untersucht. Saponin 1 erwies sich bei der Prüfung der Spontanmotilität an der Maus bei einer Dosierung von 1 mg/kg etwa als doppelt so wirksam wie Jujubosid B. Saponin 2 hatte einen um 1/3 höheren Wirkungsquotienten und war damit weniger wirksam als Saponin 1.

Da die Saponine außerdem zu einer Potenzierung der Hexobarbital-Narkose führten und eine zu Amphetamin antagonistische und zu Chlordiazepoxid synergistische Wirkung zeigten, ist die tran-
quillisierende Wirkung im Tierversuch gesichert. Die Dosis letalis
media betrug für einen Beobachtungszeitraum bis zu 7 Tagen
2010 mg/kg, so daß die therapeutische Breite sehr hoch ist.

In der Stoffklasse der Saponine sind die beiden Saponine die
ersten Verbindungen mit einer Wirkung auf das ZNS.

EXPERIMENTELLER TEIL

1.0 Herkunft der Drogen

Die Blätter von *Colubrina asiatica* wurden im September und November 1976 in Florida von Frau Professor J. Morton, Miami, gesammelt (Voucher-Nr. K 1/1976, K 2/1976).

2.0 Herkunft der Testsubstanzen

Acetyl-Ebelinlacton stellte uns Prof.R.A. Eade, School of Chemistry, University of New South Wales, Kensington, N.S.W. Australia, Hovenosid D, G und I und Jujubosid B Prof.S. Shibata, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, zur Verfügung.

Magnoflorin stammte von Prof.H. Guinadeau, Universite Paris-Sud, die Flavone Rutin und Kämpferol-3-rutinosid aus Institutsbeständen.

3.0 Allgemeine Arbeitsmethoden

3.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

3.1.1 Adsorbens

- a) Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator (F_{254}), auf Fertigplatten der Fa. Merck
Schichtdicke: 0.25 mm
- b) Cellulose-Fertigplatten ohne Fluoreszenzindikator der Fa. Merck
Schichtdicke: 0.1 mm

3.1.2 Laufmittelsysteme

Saponine:

Chloroform-Methanol-Wasser (64:36:8)

Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)

Äthylacetat-Methanol-Wasser (70:15:15)

Chloroform-Methanol-n-Propanol-Wasser (45:60:5:40; Unterphase)

Sapogenine:

Toluol-Aceton (8:2)

n-Hexan-Aceton (5:1) für Acetylsapogenin

Zucker:

auf Kieselgel

I Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10
auf Cellulose

II n-Butanol-Pyridin-Wasser (35:20:15)

III Isopropanol-Pyridin-Wasser (60:20:20)

Flavonoide:

I Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:16:14)

II Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (100:20:30)

III Äthylacetat-Äthylmethylketon-Ameisensäure-Wasser
(50:30:10:10)

Alkaloide:

Chloroform-Methanol-Wasser (64:36:8)

Cyclohexan-Chloroform-Diäthylamin (50:40:10)

3.1.3 Detektion

Nach dem Trocknen wurden die Dünnschichtplatten unter dem UV-Licht bei den Wellenlängen 254 und 360 nm betrachtet und mit einem der folgenden Reagenzien besprüht.

Sprühreagenzien

a) Saponine und Sapogenine

Komarowsky-Reagens (77)

Lösung I : 4-Hydroxybenzaldehydlösung (2% in Methanol)

Lösung II: Schwefelsäure (50%)

Sprühlösung: Kurz vor Gebrauch werden 50 ml von I mit
5 ml von II gemischt

Nachbehandlung: 3 - 5 Min. auf 110°C erhitzt,
Blaufärbung der Saponine

Vanillin-Schwefelsäure-Reagens nach GODIN (78)

Lösung I : 5 g konzentrierte Schwefelsäure werden in
100 ml Äthanol (96%) unter Kühlung gelöst.

Lösung II : 1 g Vanillin in 100 ml Äthanol (96%) lösen.

Die Platten werden nacheinander gleichmäßig mit Lösung I und II besprüht und anschließend 10 min bei 100°C getrocknet. Betrachten im Tageslicht.

Blutkörperchensuspension (20)

2 ml Citratblut (aus 100 ml 3.65%iger Natriumcitratlösung und 900 ml frischem Rinderblut) und 30 ml Phosphatpufferlösung (pH 7.4) werden vor dem Sprühen gemischt und möglichst waagrecht auf die Platte gesprüht.

b) Zucker:

Diphenylamin - Phosphorsäure

2 g Diphenylamin, 2 ml Anilin und 10 ml 85%ige Phosphorsäure werden gemischt und mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt. Nach dem Besprühen 10 min auf 100°C erhitzen.

Anilinphthalatlösung (79)

0.93 g Anilin und 1.66 g o-Phthalsäure werden in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol gelöst.

Nach dem Besprühen 10 min auf 100°C erhitzen.

Komarowsky - Reagens (siehe Saponine)

c) Flavonoide:

Naturstoffreagens nach NEU (18)

Lösung I : 1 g Diphenylborsäure- β -aminoäthylester werden
in 100 ml Äthanol gelöst.

Lösung II : Merckofix^R (Polyäthylenglycol-400-Lösung)

Die Platten werden nacheinander mit den beiden Sprühlösungen besprüht und anschließend 10 min im Dunkeln aufbewahrt. Betrachten im UV-Licht.

d) Alkaloide:

Dragendorffs Reagens nach MUNIER und MACHEBOEUFF (80)

Lösung I : 0,85 g basisches Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst.

Lösung II : 8 g Kaliumjodid werden in 20 ml Wasser gelöst.

Vorratslösung: gleiche Volumina der Lösungen I und II werden gemischt.

Sprühlösung: 10 ml Vorratslösung und 20 ml Eisessig werden mit 100 ml Wasser gemischt.

Nachbehandlung: Zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit kann nach Lufttrocknen der Platten zum Nachbesprühen 10% wässrige Natriumnitritlösung (81) verwendet werden.

3.2 Fällungsreagenzien für Alkaloide

a) VALSERS Reagens auf Alkaloidsalze (82)

10 g Kaliumjodid werden in 100 ml Wasser gelöst und unter Rühren zu ca. 15 g Quecksilber-II-jodid gegeben. Die Mischung wird solange gerührt, bis fast das ganze Quecksilber-II-jodid gelöst ist und dann filtriert.

b) MAYERS Reagens (83)

1,358 g Quecksilber-II-chlorid werden in 60 ml Wasser gelöst und in eine Lösung aus 5 g Kaliumjodid in 10 ml Wasser gerührt. Die Lösung wird auf 100 ml mit Wasser verdünnt.

Test: Zum Alkaloidscreening (s.S. 6) werden 3 Tropfen Valsers- bzw. Mayers Reagens zu 2 ml einer salzsauren Lösung gegeben und mit einer in gleicher Weise behandelten Lösung von 1 mg Brucin in 2 ml 2% HCl verglichen.

In vereinfachter Form wird dieser Test auf einem Uhrglas gegen dunklen Untergrund durchgeführt. Hierbei werden zu 1 Tropfen der wässrigen, sauren Lösung mit einer Tropfpipette vorsichtig 1 Tropfen Valsers- bzw. Mayers-Reagens derart zugegeben, daß die beiden Tropfen sich langsam miteinander vermischen.

Die Anwesenheit von alkaloidhaltigem Material wird dann vermutet, wenn bei dieser Behandlung ein Niederschlag oder eine mehr als opaleszierende Trübung auftritt.

3.3 Präparative Dünnschichtchromatographie

Adsorbens

- a) Kieselgel Fertigplatten 60 F-254 der Fa. Merck,
20 x 20 cm; Schichtdicke: 0.5 mm
- b) Kieselgelplatten, selbst bereitet
20 g Kieselgel HF 254 der Fa. Merck wurden mit 50 ml Wasser angerührt und auf 2 Glasplatten 10 x 20 cm ausgestrichen.
Die Platten wurden über Nacht bei 80°C getrocknet.

Laufmittel

Zur präparativen Trennung wurden die bei der DC angegebenen Fließmittel verwendet.

Detektion

Die Sichtbarmachung der aufgetrennten Zonen erfolgte entweder im kurzwellig UV (Sapogenine) oder durch Besprühen der getrockneten Platten mit Wasser. Die Substanzen erschienen als weiße Bänder auf grauem Hintergrund. Sie konnten so markiert und nach dem Trocknen der Platten ausgeschabt werden.

Durchführung

Die stark konzentrierten Substanzlösungen wurden bandförmig aufgetragen. Auf 0.5 mm Platten (20 x 20 cm) wurden ca. 20 - 25 mg Substanzgemisch, auf selbstgestrichene Platten (10 x 20 cm) ca. 5 - 10 mg aufgetragen.

Nach einfacher oder mehrfacher Entwicklung in den jeweiligen Laufmittelsystemen bis zu einer Höhe von ca. 17 cm wurden die unter UV-Licht bzw. nach Besprühen mit Wasser erkennbaren Zonen markiert und ausgeschabt.

Die entnommene Kieselgelzone wurde in einem Erlenmeyerkolben mit dem Elutionsmittel versetzt und einige Zeit am Magnetrührer gerührt. Anschließend wurde durch eine G 4-Fritte filtriert und mit dem Elutionsmittel nachgewaschen.

Kleinere Mengen wurden in einem Zentrifugenglas mit Glaskugeln und Elutionsmittel versetzt, kurz am Whirlimix aufgewirbelt, zentrifugiert und die überstehende Lösung durch eine G 4-Fritte filtriert. Diese Behandlung wurde mehrfach wiederholt. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, dünn-schichtchromatographisch auf Reinheit geprüft und nach dem Trocknen in der Trockenpistole für chemisch-physikalische Untersuchungen verwendet.

3.4 Säulenchromatographie

A) Kieselgelsäulen

Als Adsorbens wurden verwendet:

- a) Kieselgel 60 Merck (Korngröße 0.2 - 0.5 mm)
- b) Kieselgel 60 Merck (Korngröße 0.063 - 0.2 mm)
- c) Kieselgel 60 HF 254 Fa. Merck

Das Sorptionsmittel wurde mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt und zur besseren Sedimentierung des Kieselgels mit einem Massagestab behandelt. Die Füllung wurde mit einem Rundfilter abgedeckt und vor dem Auftragen noch einige Stdn. mit dem jeweiligen Laufmittel gewaschen, wobei die Füllhöhe konstant bleiben mußte. Die zu trennende Substanz wurde in möglichst wenig Elutionsmittel gelöst und auf die Säule aufgegeben.

Das Eluat wurde an einem automatischen Fraktionssammler in Reagenzgläsern aufgefangen und Fraktionen mit gleichem DC-Bild vereinigt.

Auftragsmengen: 0.6 g/100 g bis 1.5 g/100 g

B) Sephadexsäulen

Sephadex LH 20 der Fa. Pharmacia, Uppsala (Hydroxypropyl-Polysaccharid) wurde mit Methanol aufgeschlämmt und zur Quellung über Nacht stehen gelassen. Die Suspension wurde unter Vermeiden von Luftblasen in einem Guß in die mit einer Fritte versehene Säule gebracht. Um eine einheitliche Packung zu erreichen, wurde die Säule mit Hilfe eines Vibrators gerüttelt. Vor dem Auftragen wurde die Säule mind. 12 Stdn. durchgewaschen.

Die Substanzgemische wurden als gesättigte Lösungen zu ca. 2 - 3 ml mit der Pipette auf die Säule gegeben.

Verwendet wurden Säulen mit 2 cm Innendurchmesser und 40 - 50 cm Füllhöhe. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 15 Tropfen/min. Belastung der Säulen: 100 mg Substanz/10 g Sephadex. Bevor die nächste Substanz aufgetragen wurde, wurde die Säule einen Tag mit Methanol gewaschen.

3.5 Gaschromatographie (GC)

Die Säuren untersuchten wir am Gaschromatographen Perkin Elmer 3920, die Methylzuckeralditolacetate am Perkin Elmer 900 B.

Säule: Spiralig gebogene Glassäule 1.8 m / 4 mm ID

Säulenfüllung: Für Säuren 25% Diäthylhexylsebacinat/Sebacinsäure auf Chromosorb W-NAW (80 - 100 mesh)
für Methylzuckeralditolacetate ECNSS-M 3% auf Gas-Chrom Q (100 - 120 mesh)

Trärgas: Spezial Argon der Fa.Linde, Reinheit 99.99%

Gasdurchfluß: 30 ml/min

Detektor: Für Säuren FID range: 10 x 256

für Methylzuckeralditolacetate FID 1 x 1024

Einlaß- und Detektortemperatur: für Säuren 280 und 300°C

für Methylzuckeralditolacetate je 250°C

Säulentemperatur: 130°C isotherm

Schreiber: Perkin Elmer 56

Papiervorschub: 5 mm/min

Einspritzmenge: 3 - 6 µl

4.0 Allgemeine chemische Arbeitsmethoden

4.1 Hydrolysen

a) Salzsaure Hydrolyse

Sie wurde zur Darstellung des Aglykons angewendet. Dazu wurden 50 g des Butanolextraktes in 500 ml Methanol 90% gelöst, 70 ml Salzsäure 35% zugegeben und 4 Stdn. auf dem Dampf-

bad unter Rückfluß erhitzt. Das Methanol wurde am Rotationsverdampfer abgezogen, und zu dem schwarzbraunen Rückstand wurden 300 ml Wasser gegeben. Anschließend wurde dreimal mit je 200 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen ergaben 2,6 g Chloroformrückstand.

b) Trifluoressigsäure Hydrolyse

5 - 20 mg Saponin wurden in 1 - 2 ml 2n- oder 4n-Trifluoressigsäure gelöst und 2 Stdn. im Wasserbad unter Rückfluß hydrolysiert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 40°C zur Trockne eingeengt. Zur vollständigen Vertreibung der Trifluoressigsäure wurde mehrmals mit Methanol zur Trockne eingeengt.

c) Alkalische Hydrolysen

Zur Abspaltung der Essigsäure aus den Acylglykosiden wurden 100 mg Saponin mit 20 ml 5%iger methanolischer (80%) Kalilauge 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von 40 ml Wasser wurde am Rotationsverdampfer auf ein Viertel des Volumens eingeengt. Mit 4n-Schwefelsäure wurde auf pH 2-3 angesäuert, vom Niederschlag abfiltriert und das Filtrat mit 3 x 15 ml Äther ausgeschüttelt. Die Ätherphase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Die konzentrierte Ätherlösung wurde zur GC verwendet.

d) Partialhydrolyse

15 mg Saponin wurden in 1 ml 2n-Trifluoressigsäure gelöst und die Lösung 10 min am Wasserbad erhitzt. Die Lösung wurde wie unter 1.b) beschrieben mehrmals eingeengt.

Nach Chromatographie des Rückstandes wurde nochmals 10 min mit der gleichen Menge Trifluoressigsäure hydrolysiert und in derselben Weise aufgearbeitet.

4.2 Acetylierung

30 mg Aglykon wurden in 1 ml Pyridin p.a. (wasserfrei) und in der gleichen Menge Acetanhydrid gelöst und 2 Stdn. auf dem Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die

Lösung in 20 ml Eiswasser eingetropft. Das ausgefallene Acetat wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen bis kein Pyridingeruch mehr festzustellen war und in der Trockenpistole getrocknet.

4.3 Entacetylierung

10 mg Saponin wurden in 5 ml Methanol p.a. gelöst und nach Zugabe von 5 Tropfen Natriummethylatlösung über Nacht bei 50°C gerührt. Die Lösung wurde mit Dowex 50W-X8 neutralisiert, filtriert und einrotiert. Die Entacetylierung wurde durch ein IR-Spektrum der getrockneten Substanz nachgeprüft, da die Verbindung dünnstschichtchromatographisch auch in verschiedenen Laufmitteln den gleichen R_f -Wert wie das Acylglykosid zeigte.

4.4 Permethylierung nach HAKOMORI (50)

100 mg vollkommen trockenes und mit Hilfe von Äther vom Paraffin befreites Natriumhydrid wurden in einem 25 ml Rundkolben mit 5 ml frisch destilliertem Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und auf dem Ölbad 3 Stdn. bei 60 - 70°C mit Rückflußkühler und Calciumchloridrohr gerührt, bis eine grüne Lösung entstanden war. Die Lösung von 20 mg Saponin in 5 ml DMSO wurde dazu pipettiert und das Gemisch erneut 2 Stdn. bei 40°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur gaben wir 5 ml Methyljodid dazu und ließen die Mischung über Nacht unter Rühren reagieren. Hierauf wurde sie auf 80 ml Eiswasser gegossen und die Suspension mit 3 x 70 ml Chloroform p.a. ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen wurden einmal mit 50 ml 2%iger wässriger Natriumthiosulfatlösung, anschließend mit 2 x 75 ml Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde die Lösung filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

Ausbeute ca. 40 mg gelbe ölige Substanz. Bei der DC-Kontrolle im System n-Hexan-Aceton (9:3) zeigten sich 5 Flecken.

4.5 Methylzuckeralditolacetate nach BJÖRNDAL (45)

Das gesamte Methylproduktgemisch wurde mit 5 ml 5%iger Salzsäure 3 Stdn. unter Rückfluß am Wasserbad hydrolysiert. Die Lösung wurde mit dem basischen Anionenaustauscher Dowex 2-X8 portionsweise bis pH 6-7 neutralisiert, der Ionenaustauscher abfiltriert, mit Wasser und Methanol gewaschen und die Lösung auf ca. 5 ml eingeeengt.

Nach Zugabe von 10 mg Natriumborhydrid ließen wir die Lösung 2 Stdn. bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen. Anschließend neutralisierten wir mit dem sauren Kationenaustauscher Dowex 50W-X8. Die Lösung wurde filtriert und eingeeengt.

Der Rückstand wurde mit jeweils 5 ml Methanol versetzt und der dabei gebildete Borsäuremethylester am Rotationsverdampfer bei 40°C entfernt. Dieser Vorgang wurde mehrere Male wiederholt, bis die Borsäure quantitativ entfernt war.

Der getrocknete Rückstand der partiell methylierten Zuckeralkohole wurde in 1 ml eines 1:1-Gemisches von Pyridin-Acetanhydrid gelöst, über Nacht stehengelassen, und die Lösung anschließend auf ca. 10 ml Eiswasser gegeben. Diese Lösung wurde mit 2 x 10 ml Chloroform p.a. ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt. Diese Lösung diente zur GC.

5.0 Physikalisch-chemische Untersuchungen

Probenvorbereitung: Die Substanzen wurden über Phosphorpentoxid-Trockenmittel in einer Vakuum-Trockenpistol bei 50 - 60°C und 10^{-1} Torr getrocknet.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden auf einer Mikroheizplatte nach Kofler der Fa. Reichert, Wien, bestimmt. Die angegebenen Werte sind korrigiert.

Elementaranalysen

Die Mikro-CHN-Verbrennungsanalysen erfolgten im CHN-Analysator 185" der Fa.Hewlett-Packard bei einer Einwaage von 0.6 - 0.8 mg.

Optische Drehung

Die Drehungen wurden am lichtelektrischen Polarimeter LEP A 2 der Fa.Zeiss in Methanol gemessen.

UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit dem Spektralphotometer DK-2A der Fa.Beckman aufgenommen, mit Einwaagen von ca. 0.5 mg/50 ml Methanol p.a. der Fa.Merck.

IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit den Infrarotspektrophotometern IR 8 und Acculab 1 der Fa.Beckman aufgenommen. Zur Analyse kamen die Substanzen als ca. 1%ige Kaliumbromidpreßlinge.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer MS 30 der Fa.AEI aufgenommen.

Felddesorptions-Massenspektren wurden mit einem MAT 731 - Massenspektrometer der Fa.Varian bei Professor Dr.H.-R.Schulten, Bonn, aufgenommen.

^{13}C -NMR-Spektren

Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden im Labor der Fa.Bruker in Karlsruhe mit einem Bruker WP-250 und WP-400 (62.8 MHz und 100.62 MHz) gemessen.

Die Spektren wurden in Pyridin- d_5 bei Raumtemperatur gemessen, wobei das Kohlenstoff- 13 -Signal des Lösungsmittels als interner Standard diente.

Neben der Protonenbreitbandentkopplung wurde auch die gated-decoupled-Technik eingesetzt.

Die Spin-Gitter-Relaxationszeitmessungen wurden mit einem Varian XL-100-Gerät an der Ungarischen Akademie der Wissenschaften in Budapest durchgeführt.

¹H-NMR-Spektren

Die 60 MHz-Spektren wurden mit dem Kernresonanzspektrometer A-60 A (CW-Technik) der Fa. Varian aufgenommen. Die üblichen Konzentrationen lagen hierbei bei 20 mg auf 0.3 ml Lösungsmittel. ($\delta = 8.71$ ppm, Lösungsmittelsignal CHCl_3).

Die 500 MHz-Spektren wurden mit dem Kernresonanzspektrometer der Fa. Bruker, Karlsruhe-Rheinstetten aufgenommen.

Die üblichen Konzentrationen betrugen 40 - 90 mg auf 1 ml. Als Lösungsmittel diente Pyridin- d_5 , als interner Standard das Lösungsmittelsignal.

6.0 Spezielle Arbeitsmethoden

6.1 Untersuchung auf Alkaloide

50 g Droge wurden 1 Tag mit 500 ml Petroläther entfettet. Eine Hälfte der getrockneten Droge wurde weiterhin am Soxhlet mit 300 ml Methanol 90% extrahiert. Die andere Hälfte wurde mit 20%iger Natriumcarbonatlösung verrieben, getrocknet und mit Chloroform extrahiert.

Der eingeeengte Methanolextrakt zeigte im LM Chloroform-Methanol-Wasser (64:36:8) mehrere orange Flecken nach Besprühen mit Dragendorff-Reagens. Bei gleichem R_F -Wert (0.38) wie Magnoflorin zeigte sich im Methanolextrakt ein Alkaloidfleck. Die anderen Flecken entsprachen in ihrem R_F -Wert den Saponinen.

Die Fällungsreaktionen auf Alkaloide wurden wie unter B. 1.0 angegeben vorgenommen.

6.2 DC-Nachweis von Flavonen

25 g Droge wurden am Soxhlet 5 Stdn. mit Methanol extrahiert. Der eingeeengte Extrakt wurde in den unter 3.1.2 angegebenen Laufmitteln dünnschichtchromatographisch untersucht und zeigte folgende R_F -Werte:

Quercetin-3-rutinosid	I	$R_f = 0.4$
	II	$R_f = 0.44$
	III	$R_f = 0.35$
Kämpferol-3-rutinosid	I	$R_f = 0.48$
	II	$R_f = 0.54$
	III	$R_f = 0.46$

6.3 Hämolysischer Index

Der hämolysische Index wurde nach der Institutsvorschrift (20) in Abänderung der Arzneibuchmethoden bestimmt. Der Extrakt wurde mit 0.5 g Droge/50 ml Äthanol hergestellt. 25 ml (= 0.25 g Droge) wurden zur Trockne eingedampft und der Rückstand unter Erwärmen in 100 ml Pufferlösung gelöst. Die Bestimmung erfolgte im Reagenzglas durch Herstellen von geometrischen Verdünnungsreihen. Um die individuellen Schwankungen der Resistenz der Blutkörperchensuspension gegenüber Saponinlösungen auszuschalten, wurde mit der Standard-Saponinlösung die Versuchsreihe ebenfalls durchgeführt.

H.I. der Droge	2 000
H.I. des Saponins	17 000

7.0 Isolierungen

7.1 Isolierung der Saponingemische

Isolierung I

180 g gemahlene Colubrina-Blätter wurden mit 1.5 l Methanol 90% 2 Tage am Soxhlet extrahiert. Der Extrakt wurde vorsichtig mit je 3 x 300 ml Petroläther und Cyclohexan ausgeschüttelt. Anschließend wurde die methanolische Lösung auf etwa 600 ml eingeeengt und 3 x mit je 300 ml Chloroform ausgeschüttelt. Hierbei bildeten sich starke Emulsionen, die teilweise auch mit der Zentrifuge nicht zu trennen waren.

Ausschütteln der wässrig-methanolischen Lösung mit 3 x 300 ml Butanol ergab nach dem Einengen 6.5 g rotbraunen, sirupartigen

Extrakt. Dieser wurde in wenig Methanol 70% gelöst und in 1500 ml Äther unter Rühren eingetropft. Der etwas klebrige Niederschlag, in gleicher Weise umgefällt, ergab 2.2 g Ätherfällung.

Isolierung II

400 g gemahlene Blätter wurden 3 Tage am Soxhlet mit 3 l Methanol 90% extrahiert, der Extrakt möglichst weit am Rotationsverdampfer eingengt (starke Schaumbildung) und anschließend gefriertrocknet.

Die dunkelbraunen, klebrigen Massen wurden in 500 ml Wasser gelöst und 3 x mit je 500 ml Chloroform ausgeschüttelt. Hierbei kam es trotz vorsichtigen Schüttelns zur Bildung einer Emulsion, die durch Zentrifugieren nicht zu trennen war. Eine Trennung der Emulsion mit Natriumchlorid brachte bessere Erfolge.

Die wässrige Phase wurde nun 4 x mit 400 ml Butanol ausgeschüttelt und die organischen Phasen im Vakuum eingengt. Es ergab 50 g braunen, sirupartigen Butanolextrakt.

10 g des Butanolextraktes wurden in wenig Methanol gelöst und auf eine Al_2O_3 -Säule (75 g Al_2O_3 -neutral, Aktivitätsstufe III) gegeben und mit Methanol eluiert. Nach dem Einengen blieben noch 0.4 g gelbgrüne Substanz.

Die restlichen 40 g Extrakt wurden in 700 ml Methanol gelöst, 40 g Aktivkohle zugesetzt und 1 Tag an der Schüttelmaschine geschüttelt. Filtration und Einengen ergaben 10 g hellbraunen vorgereinigten Butanolextrakt.

Isolierung III

500 g gemahlene Blätter wurden 3 Tage am Soxhlet mit Chloroform extrahiert, um den größten Teil des Chlorophylls zu entfernen. Die Droge wurde getrocknet und anschließend 6 Tage mit 3 l Methanol 90% extrahiert. Der Methanolextrakt wurde zu einer braunen sirupösen Masse eingengt und nach Zugabe von 400 ml

Wasser zunächst mit Äther und dann mit Chloroform ausgeschüttelt. Fünfmaliges Ausschütteln mit je 400 ml Butanol und Einengen der organischen Phase ergab 150 g dunkelbraunen, zähflüssigen Butanolextrakt.

Dieser wurde in 600 ml Methanol gelöst, mit 60 g Aktivkohle versetzt und 1 Tag an der Schüttelmaschine geschüttelt. Filtration und Einengen ergeben 83 g mittelbraunen sirupösen Extrakt, der nach Zugabe von Methanol mit Hilfe einer Al_2O_3 -Filtriersäule von phenolischen Verunreinigungen befreit wurde (900 g Al_2O_3 , neutral, Aktivitätsstufe III, Elutionsmittel Methanol). Die gelbe Methanollösung wurde einrotiert; die entstandenen 15 g gelbliches Saponingemisch wurden in 100 ml Isopropanol 90% gelöst. Nach zweitägigem Stehen im Kühlschrank setzte sich eine weiße Substanz ab, die abgenutscht wurde (Ausbeute 3 g). Die restliche Isopropanollösung wurde zur Trockne eingeeengt und wie vorher behandelt. Es fielen 1.2 g einer leicht gelben Substanz aus einer braunen Lösung aus.

7.2 Auftrennung der Saponinfraktion

Säulentrennung der Ätherfällung

Adsorbens: 200 g Kieselgel 60 Korngröße 0.2 - 0.5 (Merck)

Säulenlänge: 40 cm

Säulendurchmesser: 3 cm

Elutionsmittel: Äthylacetat-Methanol-Wasser (70:15:15)

Tropfgeschwindigkeit: 20 Tropfen/min

Fraktionierung: 10 ml

Auftragmenge: 1.5 g Ätherfällung

Die Fraktionen wurden nach DC-Kontrolle zusammengefaßt und ergaben:

150 mg Saponin 1

55 mg Saponin 1 und 2

72 mg Saponin 2

Säulentrennung des mit Kohle vorgereinigten Extraktes
Adsorbens: 750 g Kieselgel 60 Korngröße 0.2 - 0.5 (Merck)
Säulenlänge: 80 cm
Säulendurchmesser: 5.5 cm
Elutionsmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (64:36:8)
Tropfgeschwindigkeit: 30 Tropfen/min
Fraktionierung: 12 ml
Auftragmenge: 10 g Butanolextrakt

Die Fraktionen wurden nach DC-Kontrolle zusammengefaßt und ergaben:

1.2 g Saponin 1
0.5 g Saponin 1 und 2
0.8 g Saponin 2

Die Über Kieselgelsäulen getrennten Verbindungen waren, wie schon an der braunen Farbe der Substanzen zu sehen, noch nicht frei von nichtsaponinischen Verunreinigungen.

Chromatographie an Sephadex LH 20

Die bei Isolierung II und III angefallenen Saponingemische wurden mit Hilfe von Sephadex LH 20 weiter aufgetrennt und gereinigt. Die Säule wurde wie unter 3.4 B) beschrieben hergestellt.

Adsorbens: Sephadex LH 20, 30 g
Säulenlänge: 60 cm
Säulendurchmesser: 2 cm
Elutionsmittel: Methanol
Tropfgeschwindigkeit: 15 Tropfen/min
Fraktionierung: 7 ml
Auftragmenge: 300 mg Saponingemisch, gelöst in 2 ml Methanol

Vorlauf: 70 ml

Fraktionen 1 - 5 56 mg Saponin 2

Fraktionen 5 - 14 210 mg Saponin 1

DCC

Die Trennungen wurden am DCC-A-Apparat (Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan) vorgenommen, der mit 300 Glasröhren ausgerüstet ist (40 cm x 2.0 mm).

Das Lösungsmittelsystem war Chloroform-Methanol-n-Propanol-Wasser (45:60:5:40). Die Saponingemische wurden in einer 1:1-Mischung der mobilen und stationären Phase eingespritzt. Die Durchflußrate war 10 ml/Stde., die Fraktionen wurden zu 3 ml gesammelt.

500 mg Saponingemisch ergaben im 1.Durchgang nach der aufsteigenden Methode 200 mg Saponin 1. Phasenumkehr mit dem aus den Röhren wiedergewonnenen Gemisch lieferte 62 mg Saponin 2.

Aus 500 mg Saponingemisch, das hauptsächlich Saponin 2 enthielt, ließen sich nach der absteigenden Methode im oben angegebenen Lösungsmittelsystem 350 mg Saponin 2 als gelbe Substanz gewinner, die noch mit Kohle von nichtsaponinischen Bestandteilen befreit wurde (270 mg Saponin 2).

7.3.1 Isolierung des Aglykons

250 g Colubrina-Blätter wurden 3 Tage am Soxhlet mit 1.5 l Methanol 90% extrahiert. Die Methanolphase wurde auf 800 ml eingengt und mit Cyclohexan ausgeschüttelt. Nach weiterem Einengen auf 500 ml wurde der Extrakt mit Chloroform von weiteren Verunreinigungen befreit. Ausschütteln mit Butanol und anschließendes Einrotieren lieferte 95 g einer klebrigen braunen Masse.

Der Butanolextrakt wurde in 900 ml Methanol gelöst und mit 140 ml Salzsäure 37% versetzt. Nach 6 Stdn. Erhitzen am Wasserbad unter Rückfluß wurde eingengt und nach Zugabe von Wasser mit 3 x 400 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen lieferten 5.5 g schwarzbraunes, klebriges Hydrolysat.

Säulentrennung des Hydrolysates

Adsorbens: 500 g Kieselgel 60 0.2 - 0.5 (Merck)

Säulenlänge: 60 cm

Säulendurchmesser: 5.5 cm

Elutionsmittel: Toluol-Aceton (8:2)

Tropfgeschwindigkeit: 20 Tropfen/min

Fraktionierung: 10 ml

Auftragemenge: 3 g Hydrolysat

Ausbeute: 21 mg Aglykon

Filtration des Hydrolysates Über Aluminiumoxid

1.2 g des Hydrolysates wurden in wenig Methanol gelöst und über eine Al_2O_3 -Säule (1 cm x 20 cm, 10 g Al_2O_3 , neutral, Aktivitätsstufe III) filtriert. Aus dem methanolischen Filtrat kristallisierte das Aglykon in rosettenförmig angeordneten weißen Kristallen aus (93 mg).

Die restlichen 1.3 g des Hydrolysates wurden in gleicher Weise aufgearbeitet. Das Aglykon kristallisierte hierbei aber nicht so schön aus und ergab nach dem Umkristallisieren nur 33 mg Aglykon.

Aglykon Ebelinlacton

$C_{30}H_{46}O_3$ (454.34) Ber. C 79.25% H 10.19%

Gef. C 78.88% H 9.71%

Smp.: 178°C (Lit.: 175 - 182°C)

DC: R_f = 0.45 (Toluol-Aceton 8:2)

UV:(MeOH) λ max nm: 269 (ϵ = 41700); 278 (ϵ = 52900);

289 (ϵ = 39600)

IR: (KBr) ν (cm^{-1})

3490 (OH); 2900 u. 2850 (CH); 1750 u. 1730 (Lacton);

1630 (Trien); 1470; 1430; 1400; 1375; 1360; 1315; 1260;

1190; 1160; 1085; 1025; 990; 945; 920; 900; 845; 805;

FD-MS: m/z

470 (2.7); 456 (9.7); 455 (34.6); M^+ 454 (100); 452 (3.2);

429 (4.3); 428 (3.2); 414 (2.7); 206 (7); 192 (2.2); 161 (2.7);

115 (4.3); 114 (2.7); 103 (4.3); 87 (2.2); 73 (2.2); 71 (1.6)

MS: m/e (mind. 10% rel.Int.)

M⁺ 454 (45); 436 (13); 381 (12); 343 (13); 331 (17); 293 (15);
281 (28); 269 (17); 243 (20); 231 (43); 219 (38); 193 (12);
181 (82); 169 (87); 161 (100); 131 (22); 119 (27); 109 (25);
107 (22); 105 (25); 100 (33); 95 (12); 93 (17); 91 (12);
81 (17); 69 (40); 59 (50); 57 (10); 51 (35); 43 (38)

¹H-NMR: (60 MHz, CDCl₃, Raumtemp., TMS int., ppm) δ

0.77 (s = 3H, 19), 0.86 (s = 3H, 28), 0.97 (s = 3H, 29,
1.05 (s = 3H, 18), 1.12 - 1.68 (m = 15H, 1,2,3,5,6,7,9,11,12),
1.78 (s = 9H, 3 vinyl Methyl, 21,26,27), 2.27 (dd = 2H, 15,
J = 10Hz, J = 18 Hz), 2.82 (verbr. s = 1H, 13), 3.2 (1H, 3-OH),
4.33 (d = 2H, 30, J = 2 Hz), 5.2 (d = 2H, 17, J = 9Hz), 5.83
(d = 1H, 22, J = 10Hz), 6.15 (t = 1H, 23, J = 14Hz), 6.31
(d = 1H, 24, J = 10Hz).

7.3.2 Acetylierung des Aglykons

33 mg Aglykon wurden mit 0.2 ml Pyridin und 0.2 ml Acetan-
hydrid wie unter 4.2 angegeben acetyliert.

Acetyllebelinlacton

C ₃₂ H ₄₈ O ₄ (496.36)	Ber. C	77.41%	H	9.76%
	Gef. C	76.97%	H	9.21%

Smp.: 192°C (Lit.: 193 - 196°C)

DC: n-Hexan-Aceton (5:1) R_f = 0.28

IR: (KBr) ν (cm⁻¹): 2950 u. 2850 (CH, 1780 (C=O), 1730 (Lacton),
1630 (Trien), 1480, 1450, 1385, 1370, 1240 (CH₂CO-), 1170,
1080, 1010, 960, 930

MS: M⁺ 496 (100), 161 (91), 43 (78)

8.1 Strukturaufklärung von Saponin 1

weißes amorphes oder feinkristallines Pulver

$C_{50}H_{78}O_{19}$ (982.5)

Smp: 192°C

DC: $R_f = 0.47$ ($CHCl_3-CH_3OH-H_2O = 64:36:8$)

0.61 ($CHCl_3-CH_3OH-H_2O = 64:50:10$)

0.30 ($EtAc-CH_3OH-H_2O = 70:15:15$)

0.18 ($CHCl_3-CH_3OH-n-Prop.-H_2O = 45:60:5:40$, Unterphase)

IR: (KBr) ν (cm^{-1})

3450 (OH); 2940 u. 2860 (CH); 1740 (Ester; 1720; 1690;

1660; 1400; 1360; 1240 (Acetyl); 1040

FD-MS: m/z (mind. 10% rel.Int.)

1091 (16); 1090 (17); 989 (16); 988 (27); 987 (32);

959 (20); 958 (33); 858 (11); 857 (13); 856 (78);

855 (100); 652 (18); 651 (35); 607 (23); 557 (15);

556 (38); 541 (14); 491 (20); 439 (35); 296 (12)

$[\alpha]_D^{26} = \pm 0$ ($c = 0.77$ in Methanol)

1H -NMR: siehe Abb. 13, S. 33 (500 MHz, 90 mg/1 ml Pyridin- d_5)

$\delta = 0.76, 0.87, 1.06, 1.12, 1.40$ ppm (je 3H, 5s, C-18-H, C-19-H, C-28-H, C-29-H, C-21-H); 1.69 u. 1.70 ppm (je 3H, 2s, C-26-H, C-27-H); 1.75 ppm (2H, dd, $J = 13$ u. 5Hz); 1.98 ppm (2H); 2.20, 2.32 ppm (je 3H, 2s, Acetyl); 2.44 ppm (1H); 2.82 ppm (1H); 3.16 ppm (1H, C-3-H); 3.5 - 4.6 ppm (13H); 4.63, 4.87 u. 5.49 ppm (3H, d, $J = 5$ Hz, anomere C-H); 5.07 ppm (1H, d, $J = 8$ Hz); 5.14 ppm (1H, ddd, $J = 8.11, 2$ Hz); 5.78, 5.85 ppm (2H, dd, $J = 10, 7.5$ Hz, C-H-OAc).

^{13}C -NMR: (100.62 MHz, 90 mg/1 ml Pyridin- d_5)

Spektraldaten siehe Tab. 1, S. 29 u. Tab. 3, S. 46

Relaxationszeiten von Saponin 1
(Varian XL-100-15; 25.16 MHz)

	(ppm)	NT ₁ (sec)		(ppm)	NT ₁ (sec)
X-1	104.6	0.21	G-4	72.1	0.165
A-1	105.0	0.18	A-3	78.7	0.167
G-1	102.9	0.17	X-4	71.1	0.23
G-3	81.0	0.17	A-4	69.6	0.19
X-3	77.9	0.22	X-5	66.9	0.27
X-2	74.5	0.22	A-5	66.0	0.19
			G-6	62.4	0.31

Qualitative und quantitative Zuckerbestimmung

40 mg Saponin wurden in 5ml 2n-Trifluoressigsäure gelöst und wie unter 4.1 beschrieben aufgearbeitet. Der Rückstand wurde in wenig Methanol gelöst und zur DC verwendet.

	Kieselgel LM I Diphenylamin- phosphorsäure	Cellulose LM II Anilinphthalat	Cellulose LM III Anilinphthalat
Glu	0.35 blau	0.29 gelbbraun	0.42 gelbbraun
Ara	0.40 braunblau	0.33 rot	0.47 rot
Xyl	0.46 braunblau	0.4 rot	0.55 rot

Zuckerbestimmung im Zuckeranalysator

4 mg Saponin 1 wurden mit 1 ml 4n-Trifluoressigsäure hydrolysiert und nach Aufarbeitung wurde das Hydrolysat in einem Zuckeranalysator (ZA 5100, Biotronik) mit einem Einpuffersystem getrennt. Das Zuckergemisch wird dabei in einem Pufferstrom (Borat-Puffer pH 9.1/0.3 m) mit ca. 30 bar über einen stark basischen Ionenaustauscher (DA-X4-20, Durrum) gepumpt. Nach Elution aus der Säule werden die getrennten Zucker in einem 20 m langen Teflon-Coil, das sich in einem Reaktionsbad mit siedendem Wasser befindet, mit dem Farbreagenz (Orcin/ H_2SO_4 , 0.1%ig) versetzt. Die sich bildenden Farbkomplexe werden anschließend in einem Durchflußphotometer bei 420 nm detektiert. Die Photometersignale werden als Extinktionswerte linear auf dem Schreiber registriert bzw. direkt von einem Integrator ausgewertet.

Die Trenndauer beträgt bei der isogradischen Trennung für das gesamte getrennte Gemisch 2 1/4 Std. Die Einspritzvolumina können 5 - 250 µl betragen.

Die Nachweisgrenze liegt unter 1 µg Einzelzucker.

Säule:	0.6 x 27 cm
Säulentemperatur:	58°C
Harz:	DA-X4-20
Boratpuffer:	pH 9.1/0.3 m
Farbreagenz:	Orcin/ H_2SO_4
Pufferdurchfluß:	60 ml/Stde.

Bestimmung des Säureanteils

50 mg Saponin 1 wurden mit 15 ml 5%iger methanolischer (80%) Kalilauge 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von 15 ml Wasser wurde auf ein Viertel des Volumens eingeeengt. Mit 4n-Schwefelsäure wurde auf pH 2 - 3 angesäuert, vom Niederschlag abfiltriert, und das Filtrat mit 50 ml Äther 5 Std. geschüttelt. Die Ätherphase wurde mit Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und zur GC verwendet.

Entacetylierung von Saponin 1

50 mg Saponin 1 wurden, wie unter 4.3 angegeben, entacetyliert. Im IR-Spektrum der aufgearbeiteten Substanz fehlte die Bande bei 1740 cm^{-1} .

Methylzuckeralditolacetate

GC: (ECNSS-M 3% auf Gas-Chrom Q, Säulentemp. 130°C isotherm, Einlaß: 250°C , 30 ml Argon/min)

Gefunden wurden (Relative Retentionszeiten = T)

2,3,4-Tri-O-methyl-xylit-1,5-diacetat T = 0.75

Testsubstanzen:

2,3,4,6-Tetra-O-methyl-glucit-1,5-diacetat T = 1.0

2,3,6-Tri-O-methyl-glucit-1,4,5-triacetat T = 2.5

8.2 Strukturaufklärung von Saponin 2

weißes amorphes Pulver

$\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{18}$ (940.4)

Smp.: 282°C

DC: $R_f = 0.54$ ($\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O} = 64:36:8$)

0.70 ($\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O} = 64:50:10$)

0.42 ($\text{EtAc-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O} = 70:15:15$)

0.35 ($\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-n-Prop.-H}_2\text{O} = 45:60:5:40$, Unterphase)

IR: (KBr) ν (cm^{-1})

3450 (OH); 2940 u. 2860 (CH); 1740 (Ester); 1720; 1690;

1640; 1440; 1370; 1280; 1250 (Acetyl); 1220; 1170; 1130;

1070; 1020

$[\alpha]_D^{26} = \pm 0$ (c = 0.66 in Methanol)

FD-MS: m/z (mind. 10% rel.Int.)

922 (14); 921 (60); 905 (37); 904 (79); 903 (85); 902 (35);

885 (20); 839 (23); 822 (22); 821 (39); 790 (33); 789 (95);

627 (37); 472 (37); 464 (23); 463 (100); 406 (18)

^1H -NMR: siehe Abb. 21, S.50 (500 MHz, 40 mg/1 ml Pyridin- d_5)
 δ = 0.7 ppm (1H, d, J = 10Hz); 0.76, 0.91, 1.09,
 1.11 ppm, 1.39 ppm (je 3H, 5s, C-18-H, C-19-H,
 C-28-H, C-29-H, C-21-H); 1.70, 1.73 ppm (je 3H, 3s,
 C-26-H, C-27-H), 1.76 ppm (2H, d, J = 13.5Hz,
 C-22-H); 1.92 ppm (1H); 2.05 ppm (1H); 2.29 ppm
 (3H, s, Ac); 2.44 ppm (1H, d, J = 8Hz); 2.80 ppm
 (1H, m); 3.17 ppm (1H, dd, J = 8, 4Hz); 3.4 -
 4.5 ppm (21H); 4.54 ppm (1H); 4.64, 5.03, 5.1 ppm
 (je 1H, d, J = 7.5Hz, anomere H); 5.14 ppm (1H,
 ddd, J = 8.11, 2Hz, C-23-H); 5.49 ppm (2H); 5.87 ppm
 (1H, dd, J = 7.5, 10Hz)

^{13}C -NMR: (100.62 MHz, 40 mg/1 ml Pyridin- d_5)
 Spektraldaten siehe Tab. 4, S. 48 u. Tab. 5, S. 55

Relaxationszeiten von Saponin 2 (Pyridin- d_5 , 90°C)

	(ppm)	$\text{NT}_1(\text{sec})$		(ppm)	$\text{NT}_1(\text{sec})$
X-1	106.0	0.30	X-2	75.6	0.32
A-1	104.8	0.23	X-4	71.1	0.32
G-1	103.4	0.24	A-4	69.3	0.22
G-2	82.7	0.24	X-5	67.1	0.31
A-3	81.0	0.22	A-5	66.5	0.29
G-5	78.3	0.25	G-6	62.8	0.48
X-3	77.9	0.30			

9. Motilitätstest im Lichtschrankenkäfig

Testgerät: Lichtschrankenkäfig nach DEWS der Fa.Laue, Elmshorn:
 19 regelmäßig über den Käfigbodenquerschnitt (0.23 cm)
 verteilte Photozellen mit einer 25 W-Lampe in 50 cm
 Abstand. Impulszähler, Stoppuhr.

Tiere: NMRI-Mäuse, männlich, 25 - 30 g Körpergewicht, ernährt
 mit Standardfutter (Altromin) und Wasser. Die Gewöh-
 nungszeit an den Versuchsraum wurde auf eine Woche
 festgesetzt.

Versuchsdurchführung:

Die Versuche wurden jeweils morgens zur gleichen Zeit an 20 Tieren durchgeführt. Je 5 Tiere wurden in einen Käfig gesetzt und nach 5 min Akklimatisationszeit 2 Stdn. lang alle 30 min die Impulsrate abgelesen. Der Kontrollversuch wurde 24 Stdn. zuvor mit den gleichen Tieren durchgeführt. Die Wirkung wurde als Quotient der Impulse nach Applikation der zu prüfenden Substanz zu den Impulsen des Kontrollversuches ermittelt. Die Reinsubstanzen bzw. Substanzgemische wurden in Propylen-glykol oder Wasser gelöst. Die Lösungen wurden den Tieren mit Hilfe einer Schlundsonde verabreicht.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) W.H.BROWN, "Useful Plants of the Philippines" Vol. II, Philippines, Dept. of Agric. and Naturel Resources, 1954
- 2) HUI-LIN LI, "Woody Flora of Taiwan", Livingston Publishing Company, 1963
- 3) W.E.SAFFORD, "Useful Plants of the Island of Guam", Smithsonian Institution: U.S.Natl.Museum, Washington, 1905
- 4) P.LIST, L.HÖRHAMMER, Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, 4.Band, Chemikalien und Drogen, 1973
- 5) HEGI, Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Bd.5/1, Lehmann's Verlag, München
- 6) R.TSCHESCHE, R.GEIPÉL u. H.-W.FEHLHABER, Phytochemistry 9, 1683 (1970)
- 7) H.GUINAUDEAU, M.LEBOEF u. A.CAVE, S.DURET, Planta med. 30, 201 (1976)
- 8) H.GUINAUDEAU, O.SELIGMANN, H.WAGNER u. A.NESZMELYI: Phytochemistry in press
- 9) M.C.WANI, H.L.TAYLOR u. M.E.WALL, J.C.S., Chem.Comm. 390 (1973)
- 10) M.C.WANI, H.L.TAYLOR u. M.E.WALL, Tetrahedron Letters 47, 4675 (1973)
- 11) J.N.ROITMAN u. L.JURD, Phytochemistry 17, 491 (1978)
- 12) J.M.COLARD, P.A.DUMONT u. F.COMPERNOLLE, Biomed.Mass Spectrom. 2, 156 (1975)
- 13) J.M.COLARD, F.COMPERNOLLE u. P.A.DUMONT, J.Pharm.Belg. 31, 199 (1976)
- 14) A.KAR, M.K.MENON u. C.S.CHAUHAN, Planta med. 18, 222 (1970)
- 15) E.GRAF u. H.FAUSS, Arch.Pharm. 310, 171 (1977)
- 16) N.R.FARNSWORTH, N.A.PILEWSKY u. F.J.DRAUS, Lloydia 25, 312 (1962)
- 17) L.A.ANDERSON, N.S.DOGGETT u. M.S.F.ROSS, Planta med. 32, 125 (1977)
- 18) R.NEU, Naturwissenschaften 44, 181 (1957)
- 19) R.HEGNAUER, Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. VI, S. 56 (1973), Birkhäuser-Verlag, Basel
- 20) Praktikumsvorschriften des Instituts für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München
- 21) K.HILLER, M.KEIPERT u. B.LINZER, Die Pharmazie 12, 713 (1966)
- 22) R.TSCHESCHE u. G.WULFF, in Zechmeister, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Springer-Verlag, Wien-New York 1973, Bd. 30
- 23) E.D.WALTER, J.Am.Pharm.Soc. 49, 735 (1960)
- 24) T.TANIMURA, J.J.PISANO, Y.ITO u. R.L.BOWMAN, Science 169, 54 (1970)
- 25) Y.OGIHARA, O.INOUE, H.OTSUKA, K.-I.KAWAI, T.TANIMURA u. S.SHIBATA, J.Chromatog. 128, 218 (1976)
- 26) H.OTSUKA, S.KOBAYASHI u. S.SHIBATA, Planta med. 33, 152 (1978)
- 27) K.HOSTETTMANN, M.HOSTETTMANN-KALDAS u. K.NAKANISHI, J.Chromatog. 170, 355 (1979)
- 28) K.HOSTETTMANN, M.HOSTETTMANN-KALDAS u. K.NAKANISHI, Helv.Chim. Acta 61, 1990 (1978)

- 29) R.A.EADE, J.ELLIS u. J.J.H.SIMES, J.C.S.Chem.Comm 2, 60 (1967)
- 30) R.A.EADE, L.P.ROSSLER, H.V.SIMES u. J.J.H.SIMES, Aust.J.Chem. 18, 1451 (1965)
- 31) G.A.BARCLAY, R.A.EADE, H.V.SIMES, J.J.H.SIMES u. J.C.TAYLOR, J.C., Chem.and Ind. 1206 (1963)
- 32) K.-I.KAWAI, Y.IITAKA, u. S.SHIBATA, Acta Cryst. B 30, 2886 (1974)
- 33) K.-I.KAWAI, T.AKIYAMA, Y.OGIHARA u.S.SHIBATA, Phytochemistry 13, 2829 (1974)
- 34) O.INOUE, T.TAKEDA u. Y.OGIHARA, J.C.S., Perkin I, 1289 (1978)
- 35) D.FENGEL, M.PRZYKLENK u. G.WEGENER, Das Papier 30, 240 (1976)
- 36) R.B.KESLER, Analyt.Chem. 39, 1416 (1967)
- 37) E.PRETSCH, T.CLERC, J.SEIBL u. W.SIMON, "Tabellen zur Struktur-
aufklärung organischer Verbindungen", Springer-Verlag, Berlin-
Heidelberg-New York 1976
- 38) W.STÖCKLIN, E.WEISS u. R.REICHSTEIN, Helv.Chim.Acta 50, 474 (1967)
- 39) K.-I.KAWAI u. S.SHIBATA, Phytochemistry 17, 287 (1978)
- 40) O.TANAKA u. S.YAHARA, Phytochemistry 17, 1353 (1978)
- 41) J.ASAKAWA, R.KASAI, K.YAMASAKI u. O.TANAKA, Tetrahedron 33, 1935 (1977)
- 42) H.OTSUKA, T.AKIYAMA, K.-I.KAWAI, S.SHIBATA, O.INOUE u. Y.OGIHARA, Phytochemistry 17, 1349 (1978)
- 43) H.OKABE, N.KOSHITA, K.TANAKA u. T.KAWASAKI, Chem.Pharm.Bull. 19, 2394 (1971)
- 44) H.BJÖRNDAL, B.LINDBERG u. S.SVENSON, Acta Chem.Scand. 21, 1801 (1967)
- 45) H.BJÖRNDAL, C.G.HELLERQUIST, B.LINDBERG u. S.SVENSON, Angew.Chem. 82, 643 (1970)
- 46) R.KUHN, H.TRISCHMANN u. I.LÖW, Angew.Chem. 67, 32 (1955)
- 47) R.KUHN, H.EGGE, R.BROSSMER, A.GAUE, H.TRISCHMANN, P.KLESSE, W.LOCHINGER, E.RÖHM u. D.TSCHAMPEL, Angew.Chem. 72, 805 (1960)
- 48) R.TSCHESCHE u. G.WULFF, Tetrahedron 19, 621 (1963)
- 49) R.KUHN u. H.TRISCHMANN, Chem.Ber. 96, 284 (1963)
- 50) S.HAKOMORI, J.Biochem.(Japan) 55, 205 (1964)
- 51) W.D.LEHMANN u. H.-R.SCHULTEN, Chemie in unserer Zeit 6, 163 (1976)
- 52) H.-R.SCHULTEN, T.KOMORI u. T.KAWASAKI, Tetrahedron 33, 2595 (1977)
- 53) H.-R.SCHULTEN, T.KOMORI, T.NOHARA, R.HIGUCHI u. T.KAWASAKI, Tetrahedron 34, 1003 (1978)
- 54) T.KOMORI, M.KAWAMURA, K.MIYAHARA, T.KAWASAKI, O.TANAKA, S.YAHARA u. H.-R.SCHULTEN, Z.Naturforsch. in press
- 55) A.NESZMELYI, K.TORI u. G.LUKACS, J.C.S.Chem.Comm 613 (1977)
- 56) E.BREITMAIER, W.VOELTER, G.JUNG u. C.TÄNZER, Chem.Ber. 104, 1147 (1971)
- 57) S.SEO, Y.TOMITA, K.TORI u. Y.YOSHIMURA, J.A.C.S. 3331 (1970)
- 58) P.A.J.GORIN u. M.MAZUREK, Can.J.Chem. 53, 1212 (1975)
- 59) O.INOUE, Y.OGIHARA u. K.YAMASAKI, J.Chem.Research (S) 144 (1978)
- 60) H.ISHII, K.TORI, T.TOZYO u. Y.YOSHIMURA, Chem.Pharm.Bull. 26, 674 (1978)

- 61) K.TORI, S.SEO, Y.YOSHIMURA, M.NAKAMURA, Y.TOMITA u. H.ISHII, Tetrahedron Letters 46, 4167 (1976)
- 62) I.KITAGAWA, T.NISHINO u. Y.KYOGOKU, Tetrahedron Letters 16, 1419 (1979)
- 63) S.YAHARA, R.KASAI u. O.TANAKA, Chem.Pharm.Bull. 25, 2041 (1977)
- 64) S.YAHARA, O.TANAKA u. I.NISHIOKA, Chem.Pharm.Bull. 26, 3010 (1978)
- 65) V.M.CHARI, M.JORDAN, H.WAGNER u. P.W.THIES, Phytochemistry 16, 1110 (1977)
- 66) S.ASEN u. R.M.HOROWITZ, Phytochemistry 16, 147 (1977)
- 67) H.ISHII, S.SEO, K.TORI, T.TOZYO u. Y.YOSHIMURA, Tetrahedron Letters 14, 1227 (1977)
- 68) K.YAMASAKI, R.KASAI, Y.MASAKI, M.OKIHARA u. O.TANAKA, Tetrahedron Letters 14, 1231 (1977)
- 69) T.KONISHI, A.TADA, J.SHOJI, R.KASAI u. O.TANAKA, Chem.Pharm. Bull. 26, 668 (1978)
- 70) I.WATANABE, H.SAITO u. K.TAKAGI, Japan.J.Pharmacol. 23, 563 (1973)
- 71) K.H.SHIN, C.K.LEE, W.S.WOO u. S.S.KANG, Arch.Pharm.Res. 1, 7 (1978)
- 72) R.SCHAETTE, Dissertation München 1971, Publikation Planta medica
- 73) K.JURCIC, Dissertation München 1974, Publikation Planta medica
- 74) W.FORTH, D.HENSCHLER u. W.RUMMEL, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich, B.I.Wissenschaftsverlag 1977
- 75) H.J.MEYER, Arch.int.Pharmacodyn.Therap. 138, 595 (1962)
- 76) G.KUSCHINSKY, R.LINDMAR, U.WOLLER u. W.FLECK, "Kurs der Allgemeinen Pharmakologie und Toxikologie", Wiss.Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1974
- 77) P.J.STEVENS, J.Chromatog. 14, 273 (1964)
- 78) H.BECKER u. S.RICHTER, Pharm.Ztg. 14, 441 (1975)
- 79) W.PESCHKE, J.Chromatog. 20, 572 (1965)
- 80) R.MUNIER u. M.MACHEBEJEFF, Bull.Soc.Chim.Biol. 33, 846 (1951)
- 81) A.PUECH, M.JACOB u. D.GANDY, J.Chromatog. 68, 161 (1972)
- 82) J.TRAVELL, J.Pharm.Sci. 33, 689 (1934)
- 83) F.F.MAYER, Am.J.Pharm. 3, 20 (1863 aus: R.MARTELLO u. N.R.FARNSWORTH, Lloydia 25, 176 (1962)

L E B E N S L A U F

Sigrid O t t	geboren am 31.8.1948 in Erlangen
Eltern	Dr.Gerhard Ott, Zahnarzt Gertrud Ott, geb. Meinike
Schulbildung	1954 - 1968 1968 Abitur am Theresien-Gymnasium Ansbach
Praktikantenzeit	1968 - 1970: in der Krankenhaus- Apotheke, Erlangen und in der Franken-Apotheke, Erlangen
Pharm.Vorexamen	September 1970
Studium der Pharmazie	WS 1970/71 - SS 1974 an der Universität Erlangen
Pharm.Staatsprüfung	Mai 1974
Approbation als Apotheker	Oktober 1974
Wissenschaftliche Tätigkeit	April 1975: Beginn der Promotions- arbeit am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner mit gleich- zeitiger Tätigkeit als wissenschaft- liche Hilfskraft.

